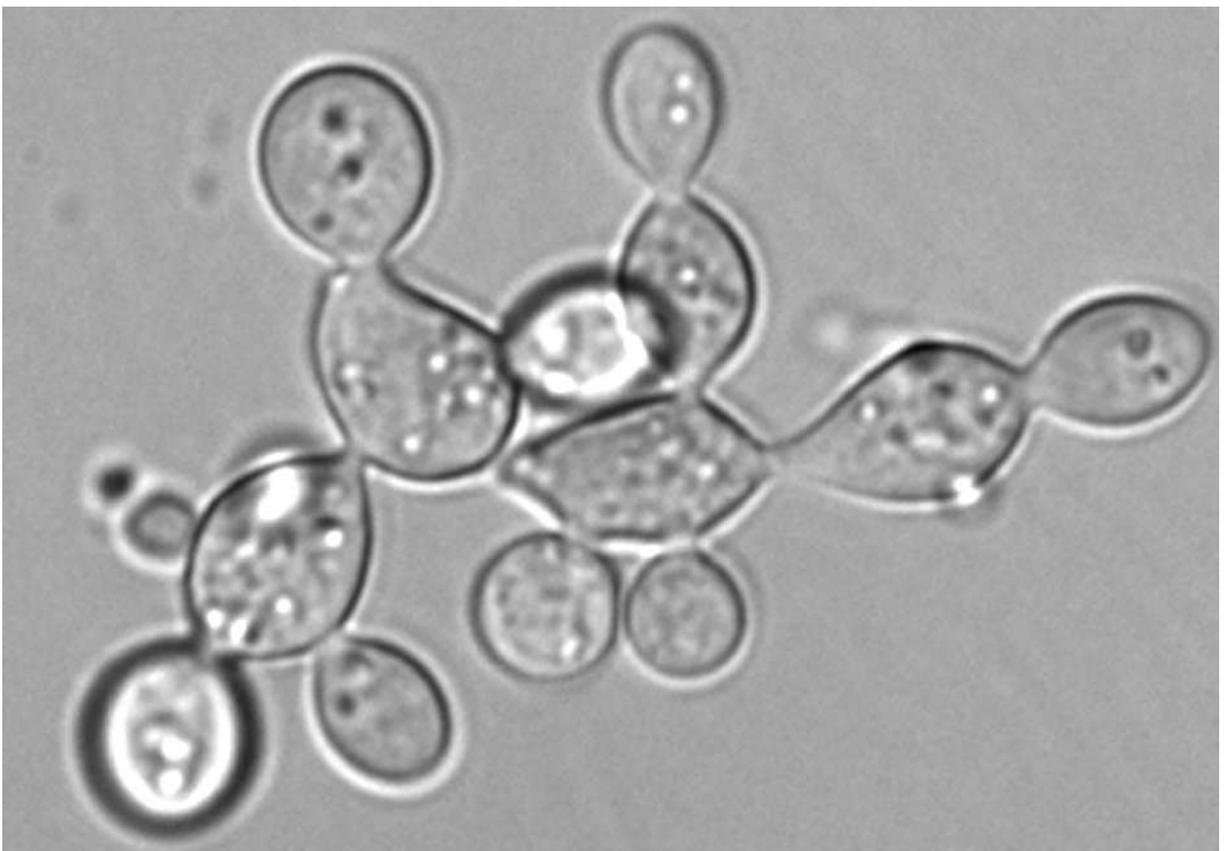


ADEMILSON PANUNTO CASTELO

Imunoterapia da paracoccidiodomicose: passado, presente e futuro



ADEMILSON PANUNTO CASTELO

Imunoterapia da paracoccidioidomicose: passado, presente e futuro

Texto sistematizado apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Livre-Docente junto ao Departamento de Biologia, Área de Imunologia.

Ribeirão Preto
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Biblioteca

Panunto-Castelo, Ademilson

Imunoterapia da paracoccidiodomicose: passado, presente e futuro / Ademilson Panunto-Castelo. Ribeirão Preto: FFCLRP, 2023.

203 f : Il.; 30 cm.

Livre-docência - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023

Versão original

1. Fungo. 2. *Paracoccidioides*. 3. Infecção. 4. Paracoccidiodomicose. 5. Imunidade. 6. Imunoterapia. 7. Vacinas terapêuticas. I. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. II. Título.

PANUNTO-CASTELO, A. **Imunoterapia da paracoccidioidomicose: passado, presente e futuro.** 2023. Tese (Livre-docência em Imunologia – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho

A minha esposa Arlete, por todos esses anos de amor, companheirismo e reciprocidade.

Canção do matrimônio

*Ver nascer em nós uma nova vida
Cheia de amor e paz
Caminharmos juntos pela Estrada
Que não termina jamais*

*Vou lhe dar um amor sem fim
O que há de melhor em mim (refrão)*

*Ser teu companheiro, estar sempre contigo
Ser o teu primeiro e melhor amigo
Dar todo carinho e a força do abraço
Na alegria e dor, seja onde for
Ser sempre teu namorado*

*Ser tua companheira, teu caminho certo
Ser tua primeira, te sentir bem perto
Dar toda ternura da mulher amada
Na alegria e dor, seja onde for
Ser sempre tua namorada*

*A meus pais, Franklin e Olga,
pelo apoio constante.*

A meu irmão Adilson e minha irmã Andréia, e aos outros irmãos e irmãs que encontrei pela vida, que mesmo, muitas vezes, distantes, dão-me a sensação de não caminhar sozinho.

A todos os meus sobrinhos e sobrinhas queridos, e seus pais e mães (caros cunhados e cunhadas), que me mostram que no coração não há um espaço limitado para o amor, mostrando que esse se multiplica, nunca se divide. Cada um ocupa um espaço especial.

AGRADECIMENTOS

Até aqui, muitas boas almas e outras não tão boas assim caminharam comigo nessa jornada, mas independentemente do que são, são caras a mim. Gostaria de agradecer a todas, sem exceção.

A todos os pós-graduandos e estudantes de iniciação científica atuais ou que já passaram pelo laboratório que coordeno, pela confiança na minha orientação e alegria e vida que trazem ao trabalho.

Aos estudantes de graduação, que ano após anos reforçam a esperança de que podemos mais.

“Aprendi muito com meus(minhas) mestre(a)s, mais com meus(minhas) colegas, mais ainda com meus(minhas) aluno(a)s” (Talmude).

Aos professores e pesquisadores que me ensinaram muito durante o tempo que estive na UNESP, *Campus* de Bauru, Hospital de Reabilitação e Anomalias Craniofaciais (CRAC/USP), Instituto Lauro de Souza Lima e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

À Prof.^a Maria Cristina Roque Barreira, pelo carinho, amizade, reciprocidade e incentivo constante na minha jornada.

A todos os servidores técnicos e administrativos que facilitam e agilizam muito nosso dia a dia. Em especial, da FFCLRP-USP: Thalita Aparecida Riul Prado Gonçalves, Susie Keiko Teixeira da Rocha, Miriam C. Osorio de Souza, Caique S. Della Mota e Denise L. T. Morgon; da FMRP-USP: Ana Cristine S. Ferreira, Sandra M. O. Thomaz, Patrícia Vendruscolo e Érica Vendruscolo, Imaculada Conceição Bragheto, Ronaldo S. Campanini (*in memoriam*), Rosângela C. P. Mesquita (*in memoriam*) e Wander Ribeiro; e EERP-USP: Elaine Santos, Eliana M. Gramegna, Eliana Braga, Eva Adlero e Silva, Fernando J. Furlanetto e Carlos R. Aveiro.

A todo(a)s o(a)s docentes e estudantes do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP e do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP, pela amizade, carinho e convivência agradável.

Aos (Às) amigo(a)s que encontrei pelo caminho. Não especificarei nenhum por medo de esquecer algum. Sei que os amigos sabem quem eles são e o que representam para minha vida.

Às agências de fomento à pesquisa, FAPESP, CNPq, CAPES e FAPEMIG e à Pró-Reitoria de Pesquisa da USP, pelo apoio fundamental para minha formação e o desenvolvimento dos estudos que compõem este trabalho, sob a forma de auxílios à pesquisa e à publicação, taxa de bancada, recursos complementares, bolsas de produtividade em pesquisa e bolsas para acadêmicos e técnico sob minha supervisão.

O correr da **vida** embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. **O que ela quer da gente é coragem.** O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza! A vida inventa! A gente principia as coisas, no não saber por que, e desde aí perde o poder de continuação porque a vida é mutirão de todos, por todos remexida e temperada. O mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. Viver é muito perigoso; e não é não. Nem sei explicar estas coisas. Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor.”

Extraído da obra Grande Sertão: Veredas de João Guimarães Rosa.

Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.
Friedrich Nietzsche

..., mais souvenez-vous que dans les champs de
l’observation le hasard ne favorise que les esprits préparés.
Louis Pasteur

Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas. Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento, todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas, todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes, criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses, jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças, todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”, todos os santos e pecadores da história da nossa espécie, ali – num grão de poeira suspenso num raio de sol. [...] Nossas atitudes, nossa pretensa importância, a ilusão de que temos uma posição privilegiada no Universo, tudo é posto em dúvida por esse ponto de luz pálido. O nosso planeta é um pontinho solitário na grande escuridão cósmica circundante. [...] Talvez não exista melhor comprovação da loucura das vaidades humanas do que esta distante imagem de nosso mundo minúsculo. Para min, ela sublinha a responsabilidade de nos relacionarmos mais bondosamente uns com os outros e de preservarmos e amarmos o pálido ponto azul, o único lar que conhecemos.
Do livro Pálido Ponto Azul de Carl Sagan

RESUMO

PANUNTO-CASTELO, A. **Imunoterapia da paracoccidioidomicose: passado, presente e futuro.** 2023. Tese (Livre-docência em Imunologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A descoberta de medicamentos iniciou-se, possivelmente, quando os primeiros hominídeos coletavam alimentos. Essas primeiras preparações eram basicamente produtos naturais e foram os únicos “remédios” que se teve notícia durante séculos. Uma nova fase de progresso nessa área ocorreu apenas após a idade média, com a purificação alquímica de drogas. Em relação às infecções, tudo mudou de figura na segunda metade do século XIX, com a *Teoria Germinal das Doenças Infecciosas*. Essa foi uma época impressionante de progresso nas ciências biomédicas, com muitos estudos incipientes que deram origem a grandes áreas de conhecimentos, dentre as quais se destaca a imunologia. Os estudos do sistema imunológico abriram várias possibilidades de uso de moléculas e micro-organismos que modificam as respostas imunitárias como terapia para eliminação de doenças ou mitigação dos seus sintomas. Essas formas de tratamentos, as imunoterapias, mostraram-se auspiciosas desde sua criação. Embora, nos vinte últimos anos, haja uma nova etapa de desenvolvimento de diversas formas de tratamentos imunoterápicos, isso se refere principalmente ao tratamento de cânceres. Apesar de alguns avanços em doenças infecciosas, a imunoterapia nas infecções sistêmicas por fungos do gênero *Paracoccidioides* – a paracoccidioidomicose (PCM), ainda é um campo pouco explorado, havendo até o momento apenas um estudo clínico, publicado em 1996. Aqui, relata-se os principais avanços em estudos pré-clínicos de imunoterapia para tratar a PCM, principalmente os relacionados às vacinas terapêuticas proteicas ou de DNA. Essas terapias seriam impactantes na vida dos pacientes com PCM, podendo ser usadas isoladamente ou em associação com os tratamentos antifúngicos convencionais, reduzindo o tempo de tratamento com esses antifúngicos, permitindo o tratamento de infecções com micro-organismos resistentes às drogas e prevenindo recidivas. Apesar das imunoterapias para PCM serem promissoras, ainda existe um longo caminho para se investigar a vasta quantidade de possíveis imunoterápicos, novos ou atualmente em testes, e desafios para que essas pesquisas sejam traduzidas em estudos clínicos.

Palavras-chave: Fungo. *Paracoccidioides*. Paracoccidioidomicose. Imunoterapia.

ABSTRACT

PANUNTO-CASTELO, A. **Immunotherapy for paracoccidioidomycosis: past, present, and future.** 2023. Tese (Livre-docência em Imunologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The discovery of medicines possibly began while the first hominids collected food. These beginning preparations were natural products and were the only known forms of medicines for centuries. A new phase of progress in this area occurred only after the Middle Ages, with the alchemical purification of drugs. For infectious diseases, everything changed in the second half of the XIX century with the foundation of the *Germ Theory of Disease*. In this time of impressive progress in the biomedical sciences, many incipient investigations gave rise to large areas of knowledge, such as immunology. Studies of the immune system have opened several possibilities for using molecules and microorganisms that modify immune responses as therapies for eliminating diseases or mitigating their symptoms. These forms of treatment, the immunotherapies, have proved to be auspicious since their inception. Although there has been a new stage in the development of some types of immunotherapies in the last two decades, this mainly concerns the treatment of cancers. Despite some advances in immunotherapy for infectious diseases, it is still a little-explored field for systemic infections by fungi of the genus *Paracoccidioides*, the paracoccidioidomycosis (PCM), with only one clinical trial published in 1996. Here, we report the main advances in preclinical immunotherapy studies to treat PCM, mainly those related to protein or DNA therapeutic vaccines. These immunotherapies might have a considerable impact on the lives of PCM patients when used only or in combination with conventional antifungal treatments by shortening therapy time, allowing the treatment of infections with drug-resistant fungi, and preventing relapses. Although PCM immunotherapies show promise, there is still a long way to go to investigate the myriad of possible immunotherapies, new or in testing, and the many challenges for translating these studies into clinical trials.

Keywords: Fungus. *Paracoccidioides*. Paracoccidioidomycosis. Immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Esquema 1-	Processo de infecção de seres humanos por fungos do gênero <i>Paracoccidioides</i>	55
Figura 1 -	ArtinM estimula macrófagos a produzir IL-12, na qual induz a produção de IFN- γ por células de baço de camundongo.....	70
Figura 2 -	Efeito terapêutico do ArtinM na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	72
Figura 3 -	ArtinM não protege camundongos IL-12 ^{-/-} da infecção por <i>P. brasiliensis</i> , mas protege uniformemente camundongos NOS2 ^{-/-} e WT, em um mecanismo de produção de IL-12 dependente de TLR2.....	73
Figura 4 -	Efeito terapêutico do adjuvante CFA na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	75
Figura 5 -	O adjuvante librado para uso em seres humanos MPLA, mas não Alúmen, ASO ₄ , e PAM ₃ CSK ₄ , tem efeito protetor similar ao observado para CFA na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	76
Figura 6 -	O tratamento com MPLA induz significativa redução de carga fúngica e manutenção da arquitetura pulmonar em camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	77
Figura 7 -	Perfil de citocinas de camundongos infectados e tratados com MPLA ou CFA	78
Figura 8 -	Fração proteica de AgPb ligante de fetuína reverte o efeito benéfico do CFA na infecção experimental com <i>P. brasiliensis</i>	84
Figura 9 -	Estrutura tridimensional da Hsp60 de <i>P. brasiliensis</i>	86
Figura 10 -	Análise da expressão de rPbHsp60 em <i>E. coli</i>	86
Figura 11 -	Localização subcelular de Hsp60 em <i>P. brasiliensis</i> por microscopia imunoelétrica.	87
Figura 12 -	Expressão diferencial do RNAm da HSP60 nas diferentes morfologias e fases de transição de <i>P. brasiliensis</i>	88
Figura 13 -	O tratamento de camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> com rPbHsp60 reverte a protetora exercida por CFA.....	89
Figura 14 -	rPbHsp60 reverte o efeito benéfico do CFA na PCM experimental.....	89
Figura 15 -	Perfil de citocinas de camundongos infectados e tratados com rPbHsp60 emulsificada ou não em CFA.....	90
Figura 16 -	A terapia de dose única com pVAX1-Pb_HSP60 em camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i> não induziu alteração na carga fúngica	92
Figura 17 -	Tratamento de camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> com três doses de pVAX1-Pb_HSP60 induz redução da carga fúngica pulmonar e das áreas lesionadas, aumento de citocinas inflamatórias e diminuição de IL-10.....	94
Figura 18.	Tratamento de camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> com três doses de pVAX1-Pb_HSP60 evita que os animais sucumbam à infecção letal com <i>P. brasiliensis</i>	95
Figura 19 -	ExoAg da cultura de levedura <i>P. brasiliensis</i> em meio sintético HAM's F12.....	98
Figura 20 -	Quantificação relativa normalizada dos níveis transcricionais do gene da AMS de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	101

Figura 21 -	Ensaio de proliferação de células esplênicas de animais injetados com MPLA induzida por AgPb e ExoAg de <i>P. brasiliensis</i>	103
Figura 22 -	Localização de Pb18_Dld em células de micélios e leveduras de <i>P. brasiliensis</i> , visualizada por microscopia imunoeletrônica.	104
Figura 23 -	Análise da expressão diferencial de RNAm DLD em micélio e levedura e nas formas de transição de <i>P. brasiliensis</i>	105
Figura 24 -	Ensaio de proliferação induzida por proteínas recombinantes de <i>P. brasiliensis</i> – DLD e gp43.....	106
Figura 25 -	Camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com DLDr tem redução significativa na carga fúngica	108
Figura 26 -	Perfil de citocinas pulmonares de camundongos BALB/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados terapeuticamente com DLD emulsificado ou não em MPLA	109

LISTA DE SIGLAS

- ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)
- AgPb – antígenos somáticos de *P. brasiliensis*
- AIM2 – inflamassomo ausente em melanoma 2 (do inglês, *absent in melanoma 2*)
- ALR – receptor similar a AIM2 (do inglês, *AIM2-like receptors*)
- AMS – α -manosidade
- APC – célula apresentadora de antígeno (do inglês, *antigen-presenting cells*)
- BCR – receptor de células B (do inglês, *B cell receptor*)
- BSA – albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*)
- BsmAb – anticorpo monoclonal biespecífico (do inglês, *bispecific mAb*)
- CAR – receptor antigênico quimérico (do inglês, *chimeric antigen receptor*)
- CD – grupamento de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*)
- cDC – DC convencional ou clássica (do inglês, *conventional DC*)
- CDP – progenitor comum de DC (do inglês, *common DC progenitor*)
- CFA – adjuvante completo de Freund (do inglês, *complete Freund adjuvant*)
- cGAS – sintase de GMP-AMP cíclico (do inglês, *cyclic GMP-AMP synthase*)
- CLEC – semelhante a lectina do tipo C (do inglês, *C-type lectin-like*),
- CLR – Receptor com domínio CLEC (do inglês, *CLEC receptor*)
- cMoP – progenitor comum de monócito (do inglês, *common monocyte progenitor*)
- ConA – concanavalina A, lectina extraída das sementes (feijões) de *Canavalia ensiformis*
- CSF-1 – fator 1 estimulador de colônia (do inglês, *colony-stimulating factor-1*)
- CTLA-4 CD152 - proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)
- DAMP – padrão molecular associado ao dano (DAMPs, do inglês, *damage-associated molecular pattern*)
- DC – célula dendrítica (do inglês, *dendritic cell*)
- DLD – dihidrolipoil desidrogenase
- DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- Fab – fragmentos de ligação ao antígeno (do inglês, *fragment antigen binding*)
- FBP – proteína ligante de fetuína (do inglês, *fetuin-binding protein*)
- FDA – agência federal reguladora do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (do inglês, *Food and Drug Administration*)
- GH – glicosil hidrolase
- GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

- HLA – antígeno leucocitário humano (do inglês, *human leukocyte antigen*)
- Hsp – proteína de estresse térmico (do inglês, *heat shock protein*)
- ICP – ponto de verificação em células T (do inglês, *immune checkpoint*)
- IFA – adjuvante incompleto de Freund (do inglês, *incomplete Freund adjuvant*)
- IFN – interferon
- IL – interleucina
- i.m. – intramuscular
- i.n. – intranasal
- i.p. – intraperitoneal
- i.t. – intratraqueal
- i.v. – intravenoso ou endovenoso
- ITAM – motivo de ativação baseado em tirosina do imunorreceptor (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)
- ITIM – motivo de inibição baseado em tirosina do imunorreceptor (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)
- ITSM – motivo interruptor baseado em tirosina do imunorreceptor (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*)
- LAG3 – CD223 - gene 3 de ativação de linfócitos (do inglês, *Lymphocyte-activation gene 3*)
- LPS – lipopolissacarídeo
- LC – célula de Langerhans (do inglês, *Langerhans cell*)
- LT – linfotóxina
- mAb – anticorpo monoclonal (do inglês, *monoclonal antibody*)
- MHC – complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)
- moDC – DC derivada de monócitos (*monocyte DCs*)
- M-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês, *macrophage colony-stimulating factor*)
- MDSC – células supressoras derivadas de células mieloides (do inglês, *myeloid-derived suppressor cells*)
- NK – naturalmente citotóxica ou matadora natural (do inglês, *natural killer*)
- NLR – receptor similar a NOD (do inglês, *NOD-like receptor*)
- NO – óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
- NOS2 – sintase 2 de NO (do inglês, *NO synthase 2*)
- NOD – receptor que contém domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeos (do inglês, *nucleotide-binding and oligomerization domain*)
- PAMP – padrão molecular associado a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*)
- PBS – solução salina isotônica tamponada com 10mM de fosfato, pH7,4 (do inglês, *phosphate buffered saline*)
- PBMC – células mononucleares de sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cells*)

- PD-1 – receptor 1 de morte programada (do inglês, *Programmed Cell Death 1*)
- pDC – DC plasmocitoide (do inglês, *plasmacytoid DC*)
- PRR – receptor de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern-recognition receptor*)
- RANKL – ligante do receptor ativador do fator nuclear capa B (RANKL, do inglês, *receptor activator of NF- κ B ligand*)
- RIG – gene I induzido por ácido retinoico (do inglês, *retinoic acid-inducible gene I*)
- RLR – receptor similar RIG (do inglês, *RIG-I-like receptor*)
- RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro
- s.c. – subcutâneo
- scFv – fragmento variável de imunoglobulina em uma cadeia única (do inglês, *single-chain variable fragment*)
- SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio, ou seja, condições dissociantes (do inglês, *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)
- STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*)
- STING – estimulador de genes de IFN (do inglês, *stimulator of interferon genes*)
- TCR – receptor de célula T (do inglês, *T cell receptor*)
- Tfh – Th folicular (do inglês, *T follicular helper*)
- TGF- β – fator β de transformação do crescimento do inglês, *transforming growth factor*)
- Th – T auxiliador ou auxiliadora (do inglês, *T helper*)
- TIGIT – imunorreceptor de células T com domínios imunoglobulinas e ITIM (do inglês, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*)
- TIM3 – proteína 3 contendo domínios mucina e imunoglobulina de célula T (do inglês, *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*)
- TNF – fator de necrose tumoral (do inglês, *tumour necrosis factor*)
- Treg – T reguladora ou regulador
- TLR – receptor similar a Toll (do inglês, *Toll-like receptor*)
- XAMP – padrão molecular associado a xenobióticos (do inglês, *xenobiotic-associated molecular pattern*)

SUMÁRIO

1	PRÓLOGO	14
2	UM POUCO DE HISTÓRIA DA IMUNOTERAPIA	14
3	A EVOLUÇÃO DA IMUNOLOGIA COMO FORMADORA DAS BASES RACIONAIS DA IMUNOTERAPIA	24
4	PROGRESSOS EM IMUNOTERAPIA	36
4.1	IMUNOTERÁPICOS NÃO RELACIONADOS A ANTÍGENO(S) ESPECÍFICOS DE PATÓGENOS, TSA OU ALÉRGENOS	36
4.1.1	<i>Micro-organismos, parasitos e seus produtos</i>	36
4.1.2	<i>Moléculas imunoestimuladoras</i>	41
4.1.3	<i>Inibidores de ICP</i>	41
4.1.4	<i>Moléculas imunossupressoras</i>	42
4.1.5	<i>Terapia com imunoglobulina intravenosa (IVIg)</i>	45
4.1.6	<i>Terapia com citocinas</i>	45
4.2	IMUNOTERÁPICOS RELACIONADOS A ANTÍGENO(S) ESPECÍFICOS DE PATÓGENOS, TSA OU ALÉRGENOS	46
4.2.1	<i>Imunoterapia passiva</i>	46
4.2.2	<i>Imunoterapia ativa</i>	50
5	IMUNOTERAPIA NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)	53
5.1	PORQUE IMUNOTERAPIA PARA DOENÇAS FÚNGICAS?	53
5.2	A PCM	54
5.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA PCM	57
5.4	IMUNOTERAPIA PARA PCM	66
5.4.1	<i>Imunoterapia inespecífica</i>	67
5.4.2	<i>Imunoterapia para PCM com antígeno(s) específico(s) de Paracoccidioides</i>	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
8	APÊNDICES	134
8.1	APÊNDICE 1	134
8.2	APÊNDICE 2	139
8.2.1	<i>Trabalhos de nosso grupo sobre imunoterapia</i>	139

1 PRÓLOGO

A imunoterapia pode ser definida como um tipo de tratamento de doenças a partir da indução, do reforço ou da supressão das respostas imunológicas. Assim, visa-se, através da imunoterapia, utilizar componentes do sistema imunitário ou outras moléculas, conhecidos coletivamente como imunoterápicos, para manipular a resposta imunológica a fim de eliminar patologias, tais como cânceres, infecções, alergias e doenças autoimunes, ou aliviar os seus sintomas [1]. A imunoterapia se mostrou promissora desde seus primórdios, no final do século XIX e início do século XX, com os estudos de Karl David Wilhelm Busch (1826-1881), Friedrich Fehleisen (1854-1924) e William Bradley Coley (1862-1936), em câncer [2,3], Emil von Behring (1854-1917), Shibasaburo Kitasato (1853-1931) e Paul Ehrlich (1854-1915), em doenças infecciosas [4,5], e Leonard Noon (1877-1913) [6] e John Freeman (1877-1962) [7], em doenças alérgicas. No entanto, poucos são os estudos que poderiam ser nomeados como significativos após essa fase inicial. Isso tudo tem mudado nas últimas décadas, principalmente nos estudos de oncologia tanto humana [8] quanto veterinária [9], a ponto dos editores da revista *Science*, em 2013, ter considerado a imunoterapia contra o câncer como a “Revelação do ano” [10]. Obviamente que, na esteira dessas conquistas, as doenças infecciosas, alérgicas e autoimunes se beneficiaram, o que contribuiu e continuará a contribuir para a diminuição de mortalidade, morbidade ou alívio de sintomas dessas patologias.

2 UM POUCO DE HISTÓRIA DA IMUNOTERAPIA

As histórias da imunoterapia e das doenças infecciosas mesclaram-se a partir do final do século XIX; um período incrível onde iniciaram-se os estudos que mostravam a existência de entidades biológicas que estabeleciam relações desarmônicas com seres humanos, dentre outros animais, bem como a forma na qual nosso organismo combatia essas entidades patogênicas. De fato, em relação à nossa história, a descoberta da existência de um mundo microbiano potencialmente patogênico é bastante recente. Isso se contrasta com a percepção que temos desde priscos tempos de que os enfermos quando se recuperavam dessas patologias, não mais as contrairiam. Sem saber a gênese dessas moléstias, os seres humanos as consideraram, bem como os seus tratamentos, como parte de uma intervenção divina.

Não é de se estranhar que a maioria das civilizações desenvolveu poções, técnicas, cultos, feitiços, orações, relíquias, amuletos e imagens para curar pessoas [11].

A despeito da medicina primitiva ligar doença e cura a algo sobrenatural, na Grécia antiga, em seu período clássico (século V a IV a.C.), a ebulição filosófica permitiu a evolução de muitos conceitos, dentre os quais se destaca a avaliação das doenças como fruto de um processo natural, sem ligação com algo transcendental [11]. A dificuldade de se definir a origem das doenças e a tradição religiosa de se assumir as dificuldades por nós enfrentadas no mundo físico a partir de uma perspectiva sobrenatural retardaram, de certa forma, a continuação de muitos avanços nosológicos obtidos por gregos e romanos. Independentemente desse desconhecimento de patogenia, algumas doenças têm seus sinais e sintomas conhecidos desde a antiguidade, como visto em papiros do Egito Antigo [12] e descrições de conceitos e classificações de enfermidades em textos mesopotâmicos datados do antigo período babilônico, a primeira metade do segundo milênio a.C. [13].

Para o tratamento das doenças, a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos iniciaram-se, possivelmente, enquanto os primeiros seres humanos coletavam alimentos. Supostamente, puderam experimentar diferentes materiais por um método de tentativa e erro, criando-se um conhecimento dos efeitos desses compostos e, por conseguinte, o alívio de determinados sintomas. É bastante plausível que extratos brutos de plantas foram os primeiros medicamentos usados para cicatrizar feridas, aliviar a dor e tratar outros tipos de sintomas. Dentre esses produtos, podemos destacar o efeito analgésico do extrato obtido da papoula (*Papaver somniferum*), datado de ~3000 a.C. [14]. O aumento no número de medicamentos foi rápido, ao ponto de serem compilados em papiros por médicos do Egito Antigo. É fato que o rolo de papiro de cerca de 20 metros de comprimento, o qual remonta a cerca de 1.200 a.C., descoberto na necrópole de Tebas pelo egiptólogo alemão Georg Ebers (1837-1898), é um dos mais importantes, haja vista que é reconhecido como primeiro livro médico, o qual apresenta uma série de doenças e inúmeras sugestões de tratamentos [12]. Há que se ter em mente que muitas terapias tiveram sua origem e desenvolvimento na medicina tradicional chinesa, Ayurvédica indiana, bem como por xamãs ou outras figuras tribais no mundo todo [11], sugerindo que a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos não são características de um povo ou cultura, mas traço comum dos seres humanos.

A história dos medicamentos passou para uma nova fase em um período excepcional para a humanidade — a renascença, a qual contou com inúmeros cientistas. Na área de fármacos, merecem distinção o médico e alquimista suíço Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), ou simplesmente Paracelso, e seus seguidores. Esses passaram a purificar alquimicamente drogas, sais metálicos, para uso em diversas doenças, tais como compostos de mercúrio em baixas doses para tratar sífilis. A Paracelso é creditada a origem do diagnóstico clínico e administração de medicamentos específicos para cada doença, numa era onde havia elixires para se curar tudo [11]. Além disso, foi pioneiro em definir a importância da dose no resultado tóxico final de um xenobiótico, abrindo caminho para a implementação do Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAEL) de uma droga, cuja importância em farmacologia é inquestionável [15,16].

Os avanços em medicina foram marcantes durante a revolução científica do século XVII, anos que surgiram médicos e pesquisadores brilhantes. Dentre esses, vale citar o médico inglês Thomas Sydenham (1624-1628), que foi o precursor da epidemiologia, da classificação das patologias, e descrição detalhada de doenças, das condições clínicas e do curso das mesmas; do pesquisador inglês Robert Hooke (1635-1703), cujo feito mais conhecido foi a primeira descrição de célula, presente em cortes de cortiça; e do comerciante de tecidos Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), o “Pai da Microbiologia”. Autodidata na ciência, Leeuwenhoek construiu seus microscópios a partir de lentes que ele mesmo confeccionava. Apesar de Robert Hooke ter sido o primeiro a descrever um micro-organismo, em 1665, um fungo microscópico do gênero *Mucor*, presumivelmente, os dispositivos de Leeuwenhoek tinham imagens melhores do que as dos microscópios de seus predecessores, possibilitando a esse cientista amador observar não apenas um micro-organismo, como fez Hooke, mas descortinar a existência de um microcosmo jamais visto por outra pessoa. As correspondências de Leeuwenhoek com a Sociedade Real de Londres, iniciadas em 1673,¹ revelou ao mundo existência desse microcosmo, sendo suas cartas traduzidas para o inglês e publicadas na revista científica *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, tornando pública suas impressionantes descobertas em termos de história natural. Os micro-organismos observados por de Leeuwenhoek, que incluíam bactérias e protozoários (animálculos), foram confirmadas por Hooke. Até mesmo a descrição de bactérias que crescem na ausência de oxigênio feita pelo cientista Louis Pasteur (1822-

¹Royal Society of London for the Promotion of Natural Knowledge

1895), em 1862, foi, na verdade, uma redescoberta, tendo em vista que Leeuwenhoek já tinha observado micro-organismos anaeróbicos e descrito em uma correspondência a Sociedade Real de Londres,¹ em 1680 [17]. De forma inexplicável, houve um hiato de quase 200 anos para que esse conhecimento fosse resgatado e pudesse se desenvolver em uma nova área de conhecimento — a microbiologia [18].

A hipótese de uma causa microbiana de muitas doenças não é nova. Em 1546, o médico e astrônomo italiano Girolamo Fracastoro (1478-1553) escreveu um tratado sobre esse assunto, intitulado *De contagione et contagiosis morbis et curatione*. Fracastoro sugeria que as *seminaria* (do latim, sementes) das doenças, minúsculos organismos de vida livre, eram os causadores das enfermidades, podendo ser transmitidas de pessoa para pessoa. Provavelmente, foi o primeiro a sugerir que a sífilis era causada por um organismo microscópico [19]. Apesar de Fracastoro e muitos outros cientistas acreditarem na origem microbiana de muitas doenças, a hipótese mais aceita nessa época era de que as doenças poderiam ser causadas por odores fétidos proveniente de matérias putrefatas, conhecidos por miasmas, e na transmissão por contato físico, ou contágio [11].

A retomada da hipótese da origem microbiana das doenças foi feita na segunda metade do século XIX por alguns cientistas, sendo os mais proeminentes, o cientista Louis Pasteur, o cirurgião inglês Joseph Lister (1827–1912) e o médico alemão Robert Koch (1843-1910). Nessa época, existia uma teoria sobre o surgimento espontâneo da vida a partir da matéria não viva (abiogênese), o que era alvo de um debate acalorado. Macroscopicamente, essa teoria da geração espontânea foi refutada pelos experimentos de Francesco Redi (1626-1698). Contudo, existia a chance de a abiogênese ocorrer microscopicamente, tendo em conta que existia um micromundo desvendado por Leeuwenhoek. Essa teoria foi abandonada de modo definitivo, em 1862, quando Pasteur mostrou experimentalmente que a geração espontânea de micro-organismos não ocorre em meios de cultura. Propôs a teoria germinal das enfermidades infecciosas, sustentando que os microrganismos são a causa dessas doenças. Tendo como base a teoria de Pasteur e suas próprias experiências, Lister mostrou que micro-organismos que produziam fermentação poderiam causar também inflamação e quando esses micróbios eram eliminados, a ferida cicatrizava sem complicações. Conceituou antissepsia, mostrando que técnicas de eliminação de patógenos durante os processos cirúrgicos diminuía as complicações inflamatórias nas feridas cirúrgicas e a alta mortalidade pós-operatória. Já Koch, estabeleceu que um

determinado germe pode causar uma doença específica. Essas conclusões foram baseadas na descoberta de bactérias presentes no sangue de ovinos que morreram de antraz. Quando inoculava ovelhas saudáveis e camundongos com essas bactérias, esses desenvolviam o antraz. Além disso, conseguiu produzir uma cultura “pura” do bacilo causador dessa patologia, o que possibilitou o estabelecimento de quatro postulados que demonstram a relação causal entre um agente infeccioso e uma doença. Além disso, Koch identificou o bacilo causador da tuberculose e o vibrião da cólera [11,18,20].

A descoberta de micro-organismos causadores das doenças infecciosas teve uma importância crucial no que se refere à possibilidade de indução de imunidade contra esses agentes. Porém, as primeiras formas de imunização deliberada que se tem conhecimento foram desenvolvidas muito tempo antes, sem qualquer compreensão microbiológica ou de processos imunológicos. O primeiro registro foi a técnica de variolação, a qual tinha uma ação profilática contra a varíola. Acredita-se que a variolação tenha sido desenvolvida na China, no século X, espalhando-se para outros locais, tais como Índia, Império Otomano, Inglaterra. O processo consistia em expor pessoas saudáveis a um pó processado a partir de crostas de pústulas de pacientes com varíola, podendo ser introduzidas por via nasal ou, de modo menos frequente, sob a pele. Por usar vírus da doença como imunógeno, sempre havia o risco da variolação causar varíola. Essa possibilidade desaparecia quando se passou a utilizar um procedimento que usava pústula de varíola bovina. Esse método foi publicado em um livro, em 1798, pelo médico inglês Edward Jenner (1749-1823), o qual descrevia todas as suas pesquisas sobre a varíola e o enorme sucesso no uso da técnica em inúmeros experimentos feitos desde maio de 1796. Como sabemos atualmente, essa alternativa é relativamente segura para proteção contra varíola porque o vírus das amostras obtidas de pústulas de bovino tem similaridades com o da varíola humana, contudo, é pouco patogênico para nós. Ao ser injetado, o vírus da varíola bovina possibilita uma imunidade cruzada e proteção contra o vírus da varíola humana. Essa vacina foi fundamental para a erradicação da varíola, cujo reconhecimento foi feito pela Organização Mundial da Saúde, em 1980 [4].

Além da teoria germinal das doenças infecciosas, Pasteur foi o primeiro pesquisador, em 1879, a produzir intencionalmente imunidade através de um micro-organismo que claramente ele conhecia. Esse processo foi descoberto em um evento serendipitoso, quando frangos foram injetados, pelo assistente de Pasteur, com uma suspensão de bactérias *Pasteurella multocida* oriundas de uma cultura “velha”. A

suspensão injetada deveria causar a cólera aviária, culminando com a morte dos animais. Ao perceber que os animais não morreram, Pasteur reinfetou os mesmos frangos com bactérias de uma cultura “nova”, onde certamente todos os frangos morreriam. Como os frangos continuavam vivos, Pasteur fez mais algumas análises e experimentos e mostrou que as bactérias poderiam ser atenuadas, condição determinante para geração de imunizantes [21].

O pioneirismo de Pasteur e de outros pesquisadores, como William S. Greenfield (1846-1919), em Londres, levou ao desenvolvimento de uma vacina para o antraz, em 1881, a partir do desenvolvimento de uma forma atenuada da bactéria *Bacillus anthracis*, o agente etiológico da doença [22,23]. Tendo como base os estudos de Pierre-Victor Galtier (1848-1908) sobre a transmissão experimental da raiva do cão para coelhos, Pasteur passou estudar essa doença, contando com a colaboração de Pierre Paul Émile Roux (1853-1933), Charles Chamberland (1851- 1908) e Louis Thuillier (1856-1883). Seus trabalhos mostraram indícios do agente causal da raiva no sangue. Através de estudos de passagem desses agentes para macacos, conseguiu a atenuação, podendo usá-lo como imunizante para cães. Também foi possível mostrar, em 1885, que a preparação era protetora contra raiva em humanos, ao fazer algumas injeções do imunizante em Joseph Meister, um menino de 9 anos mordido por um cão raivoso. Pasteur cunhou termos usados até hoje, tais como atenuação de micro-organismos e vacinação. Este último era um termo genérico para designar preparações usadas para induzir imunidade, sendo uma homenagem a Jenner que extraiu sua vacina de amostras de bovinos (do latim *vacca*) [4,24]. Esses brilhantes cientistas do final do século XIX abriram caminho para a microbiologia, imunologia, infectologia, dentre outras disciplinas, cujos desenvolvimentos científicos e tecnológicos têm promovido o aumento da qualidade de vida e longevidade dos seres humanos.

Na esteira da microbiologia, alguns pesquisadores passaram a se interessar pela identificação dos componentes responsáveis por nossa imunidade. Um dos trabalhos mais importantes foi publicado, em 1890, por Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato, os quais relataram que o sangue ou soro de coelhos previamente imunizados com o bacilo do tétano (*Clostridium tetani*) poderia ser usado para o tratamento de camundongos infectados com uma dose letal dessa bactéria. Além disso, mostraram que a letalidade da toxina tetânica era bloqueada quando essa era incubada com soro de coelhos imunizados com *C. tetani*. Nesse trabalho há uma breve descrição sobre antissoros para a difteria [25,26]. Dos trabalhos de microbiologia que abriram

caminhos para as descobertas iniciais em imunologia, certamente, merecem destaque os estudos sobre difteria feitos por Émile Roux e Alexandre Yersin (1863-1943), do Instituto Pasteur, em Paris. Eles trabalharam com o bacilo causador da difteria, que fora identificado, em 1883, por Edwin Klebs (1834-1913), e isolado, em 1884, por Friedrich Löffler (1852–1915). Entre 1888 e 1890, Roux e Yersin, em uma série de experimentos mostraram que a inoculação intradérmica de um filtrado de cultura do bacilo de Klebs-Löffler (*Corynebacterium diphtheriae*) em cobaias e coelhos induzia lesão no local da injeção. Quando aumentaram a dose, observaram que os animais apresentavam lesões sistêmicas semelhantes às da difteria. O fato dessas amostras serem filtradas e, conseqüentemente, livres de bacilos, sugeriu que toxinas eram responsáveis pela virulência dessa bactéria, sendo posteriormente, determinada que essa toxina diftérica era termolábil [27].

A descoberta de Roux e Yersin permitiram que Behring trabalhasse com a toxina diftérica e mostrasse, em um estudo publicado uma semana após a divulgação de seu trabalho com Kitasato, em 1890, que a transferência de soros de animais imunizados com a toxina diftérica protegia os animais susceptíveis dos efeitos dessa toxina diftérica [28]. Cerca de um ano depois, um soro contra a toxina diftérica foi produzido em ovelhas e administrado em duas crianças com difteria grave, produzindo um resultado extraordinário, visto que as crianças se recuperaram [4,27,29]. Por suas relevantes contribuições, as quais se tornaram a base da soroterapia, Behring teve a honra de ser o primeiro a ganhar o prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina), em 1901 [30].

Um outro grande cientista do final do século XIX e começo do século XX foi Paul Ehrlich (1854-1915), considerado por muitos como o fundador da quimioterapia moderna [31]. Ehrlich teve destacado pioneirismo no estudo dos quimioterápicos “específicos” para doenças infecciosas, no sentido do uso de substâncias químicas, especialmente aquelas produzidas sinteticamente, as quais tinham afinidade seletiva para destruir micro-organismos patogênicos com efeitos tóxicos mínimos para as nossas células. Ehrlich acreditava que existiam moléculas que poderiam se ligar aos patógenos, o que ele chamou de substâncias parasitotrópicas; todavia, tinha consciência de que essas substâncias também poderiam se associar em menor ou maior grau a receptores em nossas células, sendo também organotrópicas. Assim, imaginava que substâncias com parasitotropia e organotropia na proporção certa poderiam ser usadas como medicamentos [32]. Buscou avidamente por drogas que seriam apenas parasitotrópicas, sem efeitos colaterais decorrente da organotropia, ou seja, um

composto que funcionaria como “bala mágica” (*Zauberkegel*, em alemão). Estabeleceu um laboratório onde químicos e farmacêuticos sintetizavam compostos a serem testados experimentalmente em animais. De milhares de teste, em 1910, conseguiu um composto que foi usado para o tratamento da sífilis e tripanossomíase — o composto organoarsênico 606 ou arsfenamina, sendo patenteado como Salvarsan. Esse foi o composto mais famoso por ele desenvolvido, por se tratar do primeiro antimicrobiano moderno [5,31,33].

O brilhantismo de Ehrlich fica claro em muitos aspectos. Em 1891, ao estudar antissoros específicos para duas toxinas de plantas com propriedades lectínicas, a ricina e a abrina, usou pela primeira vez o termo anticorpo (*Antikörper*, em alemão), no sentido de molécula sérica que se liga a compostos estranhos ao nosso organismo [34]. Participou ativamente no estudo e uso de anticorpos contra difteria como um imunoterápico. Foi um dos primeiros a tentar explicar, 1897, a formação dos anticorpos, conceituando a teoria da cadeia lateral (*Seitenkettentheorie* em alemão). Contribuiu para a definição da especificidade dos anticorpos como uma propriedade química, na forma de interações estereoquímicas de receptores celulares específicos, sendo tal especificidade explicada de modo similar ao conceito de chave-fechadura para a especificidade de enzimas, um conceito proposto por Emil Fischer (1852-1919) [5]. A perspicácia de Ehrlich é algo admirável, como ao definir conceitos a respeito dos fatores séricos responsáveis pela lise de bactérias. Após a descoberta do fator sérico termolábil por Hans Ernst August Buchner (1850-1902) e colaboradores, Jules Bordet (1870-1961) descobriu que a lise bacteriana era dependente de um outro fator termoestável, chamado de sensibilizador, e do termolábil, a alexina. Então, de uma forma sagaz, Ehrlich propôs que o fator sensibilizador era um anticorpo, e que o fator termolábil, na verdade, complementava a função dos anticorpos na resposta contra patógenos, propondo que esse fator se chamasse *komplement* (complemento, em alemão) [4,35].

Embora seja lugar-comum dizer que Ehrlich era fascinado pelos anticorpos, vale salientar que isso deve ter garantido a ele a possibilidade de fazer grandes projeções. Uma delas era enxergar na especificidade dos anticorpos uma propriedade que possibilitaria seu uso direcionado a micro-organismos e células cancerosas, evitando efeitos colaterais observados com os quimioterápicos, concebendo essas moléculas como as verdadeiras “balas mágicas”, ou seja, fatores apenas parasitotrópicos [5]. Declarou, assim, em 1906, que seus estudos com antissoros

faziam parte de um novo empreendimento em quimioterapia [11,36], cunhando também o termo imunoterapia. Nas palavras de Ehrlich, “As substâncias imunológicas, ... na forma de balas mágicas, procuram o inimigo” [11]. Por suas contribuições em imunologia, em 1908, Ehrlich, juntamente com o cientista russo de origem ucraniana Ilya Ilich Metchnikoff (1845-1915), foi laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia [30].

Os estudos de Behring e Kitasato abriram caminho para que outras intervenções baseadas em antissoros começassem a ser estudadas no final do século XIX. Uma delas foi realizada pelo médico francês Léon Charles Albert Calmette (1863-1933), mais conhecido por ter desenvolvido juntamente com Jean-Marie Camille Guérin (1872-1961) uma vacina para tuberculose baseada na atenuação do *Mycobacterium bovis*, denominada BCG (bacilo de Calmette-Guérin). Calmette estudou peçonhas de serpentes e buscou protocolos de produção de antissoros em animais, padronizando a injeções repetidas de doses crescentes da peçonha, permitindo que, após o protocolo vacinal, esses animais não tivessem efeitos graves com a administração da dose letal da peçonha. A característica antitóxica desses soros foram testadas *in vitro* e *in vivo*, permitindo a Calmette sugerir que essas preparações poderiam ser usadas em pessoas que tenham sofrido um acidente por serpentes. Além disso, Calmette sugeria que os antissoros eram poliespecíficos e, assim, poderiam ser benéficos para tratamento de acidentes com outras espécies de serpente. Essa última conclusão não parecia correta, uma vez que o médico australiano Charles Martin (1866-1955), em 1898, não obteve eficácia com o soro de Calmette para o tratamento de peçonhas de serpentes australianas [37]. A mesma constatação foi feita pelo médico e pesquisador brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha (1865-1950), em 1901, com peçonhas de serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*. Vital Brazil foi além, mostrou que os antissoros que ele produziu contra peçonhas de serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* eram específicos. Produziu ainda um antissoro polivalente contra essas peçonhas ao misturar os dois antissoros [38,39]. Foi graças ao trabalho de Vital Brazil que muitos antissoros puderam ser produzidos no Brasil, salvando tantas pessoas vítimas de acidentes por animais peçonhentos.

Até aqui, mostrou-se que a imunologia, com suas respostas e moléculas específicas para as toxinas bacterianas e peçonhas, teve uma importância inquestionável para o nascimento da imunoterapia. No entanto, pesquisas com estimulações inespecíficas do sistema imunológico, no final do século XIX,

contribuíram de forma decisiva para a criação dessa área. Nesse sentido, os cirurgiões alemães Karl D. W. Busch e Friedrich Fehleisen, de um modo independente, foram os primeiros a notar a regressão de tumores em pacientes que desenvolveram erisipela. Busch, 1868, foi quem deu o início ao desenvolvimento de técnicas para diminuição de tumores por desencadeamento intencional de erisipela em paciente com câncer. Fehleisen repetiu os procedimentos de Busch, em 1882, identificando *Streptococcus pyogenes* como o agente etiológico da erisipela e responsável pela diminuição tumoral em seus experimentos [2,3].

Resultados semelhantes aos de Busch e Fehleisen foram obtidos por William B. Coley, um cirurgião estadunidense especialista em tumores ósseos. Ainda como um médico recém-egresso da faculdade, em 1890, Coley ficou impactado ao perder a jovem paciente Elizabeth (“Bessie”) Dashiell, a qual desenvolveu metástases de um sarcoma no antebraço, mesmo após o membro ter sido amputado. Procurou incansavelmente em registros hospitalares por casos em que teriam ocorrido remissão de tumores. Descobriu, então, um relato sobre o paciente Fred K. Stein, um imigrante alemão que estava condenado à morte por tumores inoperáveis, em 1884, e sobreviveu após contrair erisipela. Inclusive, Coley encontrou Stein ainda vivo e saudável sete anos após contrair erisipela [40,41]. Ele rapidamente buscou por pacientes com sarcoma em estado terminal a fim de tentar um tratamento. O primeiro caso foi de um imigrante italiano, no qual Coley injetou bactérias vivas da erisipela. A infecção desencadeou uma doença grave, mas o paciente sobreviveu e os tumores desapareceram [42]. Esse resultado o encorajou a tratar da mesma forma mais dois pacientes com sarcoma de ossos longos, obtendo novo sucesso. Esses três casos foram publicados em 1891 [41]. Aqui aparece novamente Ehrlich ao relatar que os tumores podem ser suprimidos pelo sistema imunológico, antecipando a uma conceituação da vigilância imunológica [43].

A partir de seus promissores resultados iniciais, Coley passou a tratar os pacientes com injeção de bactérias *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens*, vivas ou inativadas, nos sarcomas ósseos e de tecidos moles. A mistura dessas bactérias inativadas ficou conhecida como Toxina de Coley. Por aproximadamente 40 anos, Coley usou esse tratamento em centenas de pacientes com sarcoma, tendo resultados amplamente divulgados e discutidos pela comunidade científica. Infelizmente, alguns pacientes morreram da infecção, contudo, uma parte significativa dos tratados tiveram uma sobrevida maior em relação às expectativas de vida sem o tratamento. O

procedimento é considerado o primeiro tratamento imunológico para o câncer e, devido aos seus estudos, Coley merece o título de “Pai da Imunoterapia” [2,3,41].

Além do tratamento de doenças infecciosas e câncer, a jovem imunoterapia também passou a ser usada para modificar a resposta imunológica, isto é, desviar o padrão de resposta para aliviar alergias. Isso teve início, em 1911, com a publicação dos trabalhos de Leonard Noon (1877-1913) [6] e John Freeman (1877-1962) [7], os quais propuseram que a injeção subcutânea de extratos de pólen de quatro gramíneas poderia curar pacientes com rinite alérgica desencadeada por pólen (*hay fever*). Aparentemente, a hipótese era que a vacina geraria uma resposta imunológica específica contra as toxinas do pólen e que protegeria os pacientes. Apesar de a hipótese ser equivocada, a técnica foi eficaz em diminuir os sintomas. Essa técnica de imunoterapia continuou a ser estudada por Freeman após morte prematura de Noon, aos 35 anos [44], publicando, em 1930, um protocolo de tratamento para dessensibilização rápida (*rush desensitization*) [45]. Esse tipo de imunoterapia permaneceu sem grandes modificações após sua descoberta, aparecendo alguns importantes estudos clínicos randomizados por Frankland e Augustin, em 1954, por Johnstone e Dutton, em 1968, por Hunt e colaboradores, em 1978. Seguiram-se a esses estudos uma série de outros ensaios clínicos que confirmaram a eficácia e segurança da imunoterapia para alergias, principalmente no que se refere àquelas voltadas para alergia a peçonhas de insetos [31].

3 A EVOLUÇÃO DA IMUNOLOGIA COMO FORMADORA DAS BASES RACIONAIS DA IMUNOTERAPIA

Os estudos de Metchnikoff no final do século XIX sobre captura e destruição de partículas estranhas, tais como bactérias, por fagócitos de invertebrados e anfíbios foram impactantes e contribuíram profundamente para uma pesquisa mais contemporânea sobre imunidade de metazoários, levando-o à láurea do Prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina), em 1908, prêmio esse dividido com Ehrlich [30]. Vale mencionar um artigo de Metchnikoff, publicado em 1883, que o colocou muito à frente de seu tempo, no qual descreveu que os fagócitos de anfíbios anuros não eram exclusivamente elementos da imunidade a bactérias. Mostrou nesse trabalho que os fagócitos desses animais também eram importantes durante a transformação de girino

em anuro adulto, fagocitando células que estavam morrendo durante o processo de regressão da cauda, ou seja, já antecipava o papel dos fagócitos na eferocitose. A função dessas células na inflamação foi discutida em relação às observações que fez em larvas de um outro tipo de anfíbio, *Triton* spp. [46]. Com muita clareza, Metchnikoff declarou, em 1891, que os fagócitos faziam parte do processo inflamatório e, indo contra uma concepção daquela época, afirmou que a inflamação não deveria ser vista somente como deletéria [47]. Por fundar uma nova área da imunologia, a imunidade inata ou natural, ao mostrar a importância biológica da migração de leucócitos e fagocitose de micro-organismos como relevantes formas de defesa do hospedeiro contra infecção, através da inflamação e imunidade, com muita justiça Metchnikoff é aclamado com o título de “Pai da Imunidade Inata” [48].

Apesar de contribuir de forma monumental para o avanço no conhecimento da imunidade, Metchnikoff e seus seguidores tiveram suas descobertas ofuscadas pela pujança e a evidente relevância dos estudos de imunidade humoral e imunoterapia, capitaneados por Behring, Bordet e Ehrlich, bem como outros grandes pesquisadores de antissoros, anticorpos e proteínas do sistema complemento [4]. Embora nessa época já se conhecesse uma série de células, incluindo os neutrófilos e macrófagos, o período de adormecimento da imunologia celular foi tamanho que a descoberta de outro tipo de célula do sistema imunológico, o linfócito B, responsável pela produção de anticorpos, ocorreu somente em 1948 [49]. A importância imunológica do timo e a divisão dos linfócitos em dois principais subtipos ficaram bem estabelecidas no final da década de 1960 [50] enquanto a célula dendrítica (DC, do inglês, *dendritic cell*), a qual corresponde a um grupo de fagócitos fundamentais para se iniciar uma resposta imunológica adaptativa, foi descrita em 1973 [51].

Após essa época inicial de sua fundação, a imunologia passou para uma fase de observações clínicas e desvendamento das estruturas químicas de moléculas do sistema imunológico, principalmente dos anticorpos e de suas ligações aos antígenos. Na segunda metade do século XX houve uma mudança paulatina nas pesquisas dessa área, sendo reveladas as bases da imunidade, relativizando-se a importância que os diversos mecanismos, as moléculas e as células tinham para a manutenção da homeostase do organismo. Baseado nos trabalhos experimentais de transplantes em camundongos foi possível a George D. Snell (1903-1996) e Peter A. Gorer (1907-1961), nas décadas de 40 e 50, descobrir os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) como os

responsáveis pelo processo de rejeição de tecidos e células. No fim da década de 50, foi Jean Dausset (1916-2009) que descobriu os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês, *human leukocyte antigen*), sendo essas moléculas produzidas pelos genes do MHC [52]. A importância dos genes do MHC ficou patente com as descobertas de Baruj Benacerraf e Hugh McDevitt, nas décadas de 60 e 70, quando associaram esses genes às respostas imunológicas [53]. Outra descoberta que abriu caminhos para a compreensão dos mecanismos de imunidade adaptativa foi feita por Peter C. Doherty (1940-) e Rolf Zinkernagel (1944-), os quais demonstraram, em 1975, que as moléculas codificadas por genes do MHC desempenham um papel essencial no reconhecimento de antígenos por linfócitos T [54]. Por seus trabalhos Snell, Benacerraf, Dausset, Doherty e Zinkernagel foram laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina) [30].

Nesta nova era, uma das hipóteses que deram novo fôlego à imunologia, mais especificamente para as respostas por anticorpos, foi a teoria da seleção clonal, proposta, em 1956, pelo virologista e imunologista australiano Frank Macfarlane Burnet (1899-1985), ganhador do Prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina), em 1960 [30]. Nessa hipótese, que teve como alicerce as teorias do imunologista dinamarquês Niels K. Jerne (1911-1994) e estava em consonância com as ideias do imunologista americano David W. Talmage (1919-2014), Burnet aventou que cada linfócito B expressa receptores específicos para um antígeno, os quais são gerados antes mesmo de encontrar essa molécula, e que o repertório de γ -globulinas demandava um processo genético para a randomização de suas especificidades. A ativação da célula B, sua proliferação clonal e, por conseguinte, a secreção de anticorpos ocorriam quando o receptor linfocítico ligava-se ao antígeno, fazendo com que a expansão dos linfócitos em clones específicos fosse um processo direcionado pelo antígeno, permanecendo em modo de espera os linfócitos com especificidades para outros antígenos [4,18,55]. Essa hipótese demorou para ser aceita, mas provou-se correta através dos trabalhos do cientista japonês Susumu Tonegawa (1939-), ganhador do Prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina), em 1987 [30]. Tonegawa mostrou que receptores de células B e T são produzidos por recombinação gênica, possibilitando que trilhões de proteínas sejam geradas a partir de dezenas de genes [56]. De certa forma, já havia uma dica da veracidade da hipótese de Burnet dada pelo trabalho dos ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina) de 1984, os cientistas César Milstein (1927-2002) e Georges J. F. Köhler (1946-1995) [30]. Em 1975, eles desenvolveram um dos imunobiológicos

mais conhecidos — o anticorpo monoclonal (mAb, do inglês, *monoclonal antibody*). Milstein e Köhler fundiram células de um mieloma murino com plasmócitos esplênicos de camundongos imunizados com hemácias de carneiro, dando a essas células fundidas (hibridomas) a característica das células do mieloma de crescimento permanente e dos plasmócitos de produção de anticorpos. Assim, obtiveram clones únicos de plasmócitos imortalizados que produziam anticorpo de especificidade única, o mAb [57]. O uso dos mAbs nas mais diversas áreas das ciências biomédicas é impressionante, permitindo grandes avanços, incluindo a geração de inúmeros anticorpos imunoterápicos para muitas doenças [58].

As décadas de 1960 e 1970 foram muito ricas para a imunologia, aparecendo muitas hipóteses e descobertas em relação (1) à aquisição da tolerância imunológica, uma vez que o sistema imunitário necessitaria distinguir o que é próprio daquilo que não o é, respondendo ao estranho e tolerando o que é próprio do organismo; (2) à especificidade única tanto de anticorpos (imunoglobulinas) produzidos por apenas um linfócito B como dos receptores de célula T (TCR, do inglês, *T cell receptor*) de um único linfócito T; (3) aos mecanismos efetores de resposta celular; (4) à comunicação celular através de receptores e citocinas; (5) e à integração da imunidade adaptativa à imunidade inata [4]. Nessa época, antes mesmo dos estudos de Doherty e Zinkernagel sobre resposta imunológica e MHC, apareceram os primeiros relatos sobre a cooperação entre linfócitos T e B. Vale o relato que o termo linfócitos T auxiliador (Th, do inglês, *T helper*) já era bastante utilizado em 1972, ano onde foi feita a descrição de que essa cooperação entre células T e B exigia compatibilidade do MHC, sem terem o conhecimento do real papel dessas moléculas do H-2 (denominação do MHC de camundongos) [59].

Tendo como base os marcadores de superfície celular conhecidos atualmente como CD4 e CD8, os linfócitos T foram subdivididos — as células Th como positivas para o marcador CD4⁺ e negativas para o CD8⁺, e as células T citotóxicas, positivas para CD8⁺ e negativas para CD4⁺ [60–62]. Em 1986, com os trabalhos de Timothy R. Mosmann (1949-) e Robert L. Coffman (1948-), as células Th foram dicotomizadas fenotipicamente em células Th do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2), tendo como base a produção de citocinas desses subtipos. Foi mostrado que os linfócitos Th1 tinham como marcação fenotípica a produção de interferon (IFN-) γ enquanto os linfócitos Th2 apresentavam a produção de interleucina (IL-) 4. IFN- γ e linfotóxina- α (LT- α) produzidos por células Th1 mostraram-se importantes para ativar macrófagos,

resultando no aumento da capacidade dessas células de eliminar patógenos intracelulares, bem como para o desenvolvimento da hipersensibilidade retardada, ao passo que as citocinas de linfócitos Th2, IL-4 e IL-5, estariam mais ligadas à função de auxiliadoras de resposta humoral, sendo importantes também para o desenvolvimento de imunidade a helmintos, assim como de hipersensibilidade imediata [4,63,64].

Alguns trabalhos produzidos a partir dos estudos de Mosmann e Coffman mostraram mais claramente que a dicotomia Th1/Th2 ocorria por um sistema de três sinais, sendo o primeiro sinal antígeno-específico, via TCR, o segundo sinal sem especificidade antigênica por molécula linfocítica coestimuladora CD28 que se ligava a CD80 ou CD86 das células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês, *antigen-presenting cells*) e um terceiro sinal promovido por ligação de citocinas aos seus receptores presentes nos linfócitos Th. Assim, IFN- γ e IL-12 associados aos seus receptores estimulam a sinalização pelo transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT, do inglês, *signal transducer and activator of transcription*) 1 e STAT4, respectivamente, culminando com a ativação do fator de transcrição T-bet, que induz citocinas do padrão Th1 e inibe os genes envolvidos com o desenvolvimento de células Th2. Por outro lado, a ligação de IL-4 a seu receptor ativa o fator de transcrição GATA-3 via STAT6, o qual regula genes importantes para a diferenciação do linfócito para Th2, bem como reprime genes envolvidos com o desenvolvimento de células Th1 [65], o que inibe a indução de células Th1 [66].

Ainda no final da década de 80, uma outra descoberta dá a imunidade inata uma maior relevância. Nessa época, os imunologistas ainda eram influenciados pelos estudos de Karl Landsteiner (1868-1943), laureado com Prêmio Nobel de Fisiologia (Medicina), em 1930 [30], cujos experimentos de especificidades das reações sorológicas possibilitaram a ele sugerir que as macromoléculas são igualmente capazes de dar origem a uma resposta imunológica (Landsteiner, 1945). Se esse fosse o caso, a distinção feita pelo sistema imunológico entre o que era próprio do que era estranho ao nosso organismo, proposta introduzida em 1959, por Burnet e Frank Fenner (1914–2010) [67], dependeria apenas do reconhecimento antigênico que os linfócitos T e B fazem a partir de seus TCRs e BCRs (receptores de células B - BCR, do inglês, *B cell receptor*), respectivamente. Essa hipótese era bastante plausível, pois o repertório de reconhecimento antigênico da imunidade adaptativa pode chegar à casa de trilhões de especificidades diferentes e esses receptores antígeno-específicos de linfócitos não são produzidos diretamente de genes presentes no genoma, mas indiretamente pela

recombinação gênica, o que permite a geração de imensa quantidade de possíveis especificidades para esses receptores. Foi nesse ponto que as predições e a genialidade de Charles A. Janeway Jr. (1943-2003) fizeram toda a diferença, modificando essa visão “landsteineriana” sobre a indução da resposta imunológica. Em uma palestra, em 1989, no *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, Janeway propôs que as células da imunidade inata conseguem detectar a presença de patógenos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês, *pattern-recognition receptors*), sendo distribuídos nos espaços extracelular e intracelular. Pelo fato de serem codificados diretamente de seus genes correspondentes e pela quantidade limitada de genes no genoma dos seres humanos e de camundongos, existia uma restrição na quantidade de tipos de PRRs. Porém, isso não constituiu em si um problema para essa hipótese, uma vez que cada tipo de PRR reconhece moléculas bastante conservadas em grandes grupos de patógenos, coletivamente conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*) (Janeway, 1989). Para se ter uma ideia, um dos PRRs denominado receptor Toll-símile (TLR, do inglês, *Toll-like receptor*) 4 — presente na membrana plasmática de fagócitos, tais como DCs, macrófagos e neutrófilos — tem a capacidade de se ligar a lipopolissacarídeo (LPS) que está contido na membrana externa da parede de bactérias Gram negativas. Logo, com apenas TLR4, essas células podem fagocitar praticamente todas as inúmeras espécies de bactérias que expõem o LPS em suas paredes [68]. Obviamente, os PAMPs não são moléculas próprias do hospedeiro e, assim, servem como indicadores de infecção e para distinção entre o que é perigoso do que é inofensivo para o nosso organismo, satisfazendo de certa forma a teoria do perigo (*danger theory*), proposta por Polly Matzinger, em 1994 [69], que se constitui em um modelo alternativo para a teoria do próprio-não próprio proposta por Burnet e Fenner [70].

Após as previsões de Janeway, uma série de PRRs e PAMPs foram descobertos, sendo esses últimos moléculas estruturais de bactérias, fungos e vírus, e de moléculas biossintéticas, tais como DNA e RNA [71]. Até o momento, os PRRs podem ser classificados em uma de seis famílias de proteínas, sendo elas: (1) TLRs, (2) receptores que contém domínio semelhante à lectina do tipo C (CLR) (do inglês, *C-type lectin-like receptor*), (3) receptores que contém repetições ricas em leucina com domínio de ligação de nucleotídeos (NLRs, do inglês, *nucleotide-binding and oligomerization domain [NOD]-like receptors*), (4) receptores similares ao gene I induzido por ácido

retinoico (RLRs, do inglês, *retinoic acid-inducible gene 1 [RIG-I]-like receptors*), (5) receptores similares a AIM2 (ALRs, do inglês, *Absent in melanoma 2 [AIM2]-like receptors*) e (6) sintase de GMP-AMP cíclico (cGAS, do inglês, *cyclic GMP-AMP synthase*) e estimulador de genes de IFN (STING, do inglês, *stimulator of interferon genes*) (via cGAS-STING). Os dois primeiros grupos de PRRs são proteínas integrais de membrana da superfície celular e de vesículas intracelulares, tal como o endossomo enquanto os quatro últimos são sensores intracelulares de PAMPs [72].

O fato de a imunidade inata ser constituída por (1) barreiras anatômicas e químicas, (2) células especializadas, tais como células fagocíticas, mastócitos, células naturalmente citotóxicas (NK, do inglês, *natural killer*) e células linfoides inatas, e (3) proteínas sanguíneas, fez com que durante muito tempo esse tipo de imunidade fosse genericamente descrita como inespecífica. A descoberta dos PRRs torna inapropriado o uso de generalizações sobre a imunidade inata, existindo uma variação significativa em termos de reconhecimento — de barreiras sem qualquer especificidade para cumprir sua função de impedir a entrada de patógenos a PRRs de fagócitos com certo grau de especificidade para seus respectivos PAMPs [73]. O conhecimento sobre detecção de moléculas que sinalizam perigo para o organismo vem se alterando e se expandindo nos últimos anos, com descoberta de que moléculas exógenas pequenas, tais como metabólitos microbianos, dietéticos fitoquímicos e poluentes, podem ser reconhecidas por PRRs [74], sendo coletivamente designadas de padrões moleculares associados a xenobióticos (XAMPs, do inglês, *xenobiotic-associated molecular patterns*) [75]. Ainda mais interessante foi a descoberta que as moléculas que sinalizam perigo podem ser endógenas, principalmente as que são liberadas de células lisadas ou danificadas, o que passou a ser chamado de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês, *damage-associated molecular patterns*), tais como ácido hialurônico, histonas, ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), cristais de colesterol, dentre outras [72]. Vale salientar que nas infecções, a ação dos DAMPs pode ser somada à de PAMPs, uma vez que a maioria dos patógenos causam a destruição direta ou indireta de células. Ainda em relação aos DAMPs, se por um lado, promovem inflamação estéril, importante para o reparo e regeneração tecidual, por outro, podem induzir inúmeras doenças inflamatórias, inclusive distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e câncer [76].

Quando os PRRs e outros receptores de imunidade inata associam-se a seus ligantes exógenos ou endógenos induzem, no citosol, uma cascata de ativação de

enzimas e outros mensageiros químicos, que culmina com a ativação de fatores de transcrição, os quais são exportados para o núcleo, onde ligam-se a promotores que estimulam transcrição de genes, cujos efeitos são (1) a produção de citocinas, quimiocinas, hormônios e fatores de crescimento, (2) formação de um microambiente inflamatório, (3) eliminação de células mortas e reestruturação dos tecidos lesados após eliminação do estímulo flogístico, (4) indução de inflamação crônica, quando há a manutenção do agente inflamatório e (5) transição da imunidade inata para a adaptativa [77]. Além disso, PRRs também iniciam respostas não transcricionais, tais como fagocitose, autofagia, apoptose e processamento de citocinas [71].

Apesar da imunidade inata barrar, controlar e eliminar a maioria dos agentes potencialmente patogênicos ao nosso organismo, alguns desses agentes e algumas células cancerosas apresentam mecanismos de escape dessa imunidade [73]. Para eliminar os agentes que se evadem da imunidade inata, foram desenvolvidos, em vertebrados, mecanismos de respostas imunológicas adaptativas que são altamente diversos e específicos aos antígenos e que se sobrepõem e complementam os mecanismos de imunidade inata – esses são coletivamente conhecidos como imunidade adaptativa ou adquirida [78].

Os macrófagos e as DCs são células mononucleares tissulares geradas a partir de precursores da medula óssea e que tem uma enorme importância para imunidade inata e adaptativa. No caso dos macrófagos, esses são liberados da medula óssea na corrente sanguínea como monócitos, os quais tornam-se células residentes ao adentrarem ao tecido. Nessa condição, na dependência de sua distribuição e função nos diferentes órgãos e tecidos, os macrófagos apresentam uma pluralidade de morfologias e fenótipos [79]. Os monócitos também podem migrar via estimulação por citocinas e quimiocinas liberadas em tecidos inflamados, havendo consenso que a atividade biológica dessas células é mediada por subpopulações fenotipicamente distintas que são geradas em resposta a mediadores que se encontram no microambiente inflamatório tecidual. Apesar da natureza heterogênea e espectral da ativação dos macrófagos, esses são divididos em três tipos: macrófagos não ativados (M0), pró-inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios (M2). Os macrófagos M1 são comuns em ambientes inflamatórios, os quais são dominados por sinalizações desencadeadas por TLRs e IFN- γ , sendo mais relacionados à imunidade a bactérias e patógenos intracelulares. Macrófagos M2, por sua vez, são encontrados em ambientes com respostas anti-inflamatórias e as típicas de imunidade a helmintos e processos

alérgicos [80,81]. Os estudos dos macrófagos têm evoluído bastante e levado a uma atualização substancial da nomenclatura. Por exemplo, os monócitos podem ser diretamente polarizados em três subconjuntos de macrófagos com o fenótipo pró-inflamatório tipo M1 em resposta a estímulos pró-inflamatórios enquanto vários estímulos anti-inflamatórios diferenciam os monócitos em pelo menos cinco subtipos de macrófagos M2 [81].

Diferente dos macrófagos que têm como precursor apenas o progenitor comum de monócito (cMoP, do inglês, *common monocyte progenitor*) [82], as DCs podem ter uma origem mais diversa. As DCs derivadas de monócitos (moDCs - *monocyte DCs*) originam-se de cMoP, as DCs convencionais ou clássicas (cDC - *conventional DC*) do tipos 1, cDC2 e DCs plasmocitoides (pDCs - *plasmacytoid DCs*) tem o progenitor comum de DCs (CDP - *common DC progenitor*) como precursor, enquanto as células de Langerhans (LCs - *Langerhans cells*) derivam principalmente de monócitos do fígado fetal que colonizam a pele e mucosa durante a embriogênese e mantêm-se por proliferação local por ação de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, do inglês, *macrophage colony-stimulating factor*) e IL-34 [83].

Para a transição da imunidade inata para a adaptativa, as DCs têm um papel fundamental. Essas células são residentes dos tecidos em uma condição determinada como imatura e comportam-se de modo similar a macrófagos, no sentido de serem fagócitos altamente eficientes para promover a endocitose de partículas estranhas, no entanto, elas têm pequena capacidade de apresentar antígenos para os linfócitos T. Ao serem estimuladas via PRRs, além de algumas respostas transcricionais comuns a fagócitos ativados por esses receptores, passam a expressar o receptor CCR7 que se liga a quimiocinas CCL19 e CCL21, as quais são produzidas em zonas de linfócitos T em órgãos linfoides secundários. Por conseguinte, as DCs CCR7⁺ migram do tecido para a zona de linfócitos T do órgão linfoide secundário, tal como linfonodo. Em relação a captura de antígenos da circulação sanguínea, as DCs fazem um processo de migração intraesplênica [84]. A chegada das DCs aos tecidos linfocitários permite que se encontrem com linfócitos T *naïves* que recirculam entre o tecido linfoide, sistema circulatório sanguíneo e vasos linfáticos, mas não nos demais tecidos. Além da expressão de CCR7, ocorre também uma série de mudanças nas DCs enquanto migram em direção ao tecido linfoide, tornando-se uma célula madura. Em contraposição à condição imatura, as DCs maduras têm uma diminuição significativa da competência fagocítica, além de um aumento substancial em sua capacidade de apresentação

antigênica e diferenciação de linfócitos T *naïves* através do sistema de três sinais, já comentado anteriormente. Essas características dos linfócitos T *naïves* e das DCs fazem do órgão linfoide periférico o local de ativação dos linfócitos T e, conseqüentemente, de iniciação uma resposta imunológica específica e especializada para eliminação do agente patogênico [85].

Como descrito previamente neste texto, os estudos de Mosmann e Coffman, em 1986, foram um marco na imunologia por alguns motivos. Dentre esses, acredito que os principais foram: (1) iniciar o desvendamento dos mecanismos subjacentes à especialização das respostas imunológicas, ou seja, a capacidade do sistema imunológico de responder a antígenos muito diversos e que aparecem em diferentes locais em nosso organismo, e (2) inspirar pesquisadores a buscarem a forma pela qual outras células do sistema imunológico influenciam na especialização da resposta, tais como subtipos de macrófagos e de DCs.

Além de desempenhar um papel fundamental de iniciar respostas imunológicas adaptativas, apresentando antígenos e expressando receptores coestimuladores, por conseguinte, ativando os linfócitos Th, as atribuições das DCs podem ainda variar no que se refere à diferenciação de linfócitos Th, o que tem relação com os subtipos heterogêneos em termos fenotípicos e funcionais dessas células [73]. Aparentemente o desenvolvimento dos subtipos de células T CD4⁺ Th1 e Th2 coincide com os subtipos de DCs que as ativou. Na literatura, até o momento, a maioria dos estudos mostram que o subtipo de cDC1s são capazes de induzir a ativação de células T CD8⁺ e a diferenciação de células T CD4⁺ *naïve* em Th1 ou Th17, enquanto o subtipo de cDC2s promove a diferenciação para células Th2, podendo ocorrer desvio para Th17. Nesse caso, há um processo dependente do fator de transcrição KLF4 para cDC2s induzirem diferenciação para Th2, enquanto na ausência desse fator o desvio ocorre para Th17. Tanto cDC1s quanto cDC2s são capazes de capturar antígenos e migrar para linfonodos para o início de respostas imunológicas adaptativas, contudo, elas diferem em sua capacidade de resposta a sinais migratórios e inflamatórios no microambiente e em sua capacidade de induzir a ativação ou regulação de células T [86,87]. As cDC2s também diferenciam células T CD4⁺ *naïve* em Th foliculares (Tfh, do inglês, *T follicular helper*), as quais cooperam com as células B a fim de gerar troca de classe e maturação de afinidade das imunoglobulinas, bem como a geração de células B de memória. Provavelmente, essa discrepância na diferenciação para Th2 ou Tfh está associada ao local onde estão as DCs no tecido linfoide secundário [88].

Devido a sua localização, as LCs correspondem a um subtipo importante para captura de antígenos da pele e mucosa, uma função que parece ser compartilhada com cDC2s. As cDC2s e LCs produtoras de IL-6 e IL-23 favorecem a diferenciação de células Th17, sendo pouco conhecido sobre a localização dessa interação. LCs também podem diferenciar células T CD4⁺ *naïve* em células Tfh ou Th17 a depender do estímulo no microambiente tecidual [86,89]. Já as pDCs são consideradas são um tipo de célula sentinela especial que pode detectar ácidos nucleicos de patógenos, principalmente de vírus, como PAMPs. Em resposta, produzem IFN do tipo I de forma rápida e em grande quantidade, sendo uma das principais fontes dessa citocina [90], cuja ação antiviral em mamíferos é fundamental [91]. Não é surpreendente, mas bastante interessante, que antígenos próprios, por exemplo, fazem que DCs promovam o desenvolvimento células T reguladoras (Treg) induzidas, que assim como as células Treg naturais são cruciais para a manutenção da autotolerância imunológica e homeostase [86].

De fato, a complexidade das interações no microambiente linfóide dificulta a análise e determinação do papel de cada subtipo de DCs. Ademais, existe a possibilidade de colaboração entre os subtipos de DCs. Por exemplo, pDCs CCR5⁺ atraídas por quimiocinas para locais de interações entre células T CD8⁺ e cDC1s, permitem com que haja estimulação das funções de cDC1s por meio produção de interferon tipo I. Assim, as pDCs que migram para as cercanias dos locais onde está havendo interação células T CD8⁺-cDC1s atuam como um componente relevante para a natureza e magnitude das respostas das células T CD8 [92].

Com essas informações acima mostrando a relevância das DCs para a modulação das respostas imunológicas, não é de se estranhar que sejam candidatas naturais a imunoterápicos, já sendo descritas em muitos estudos como valorosas para diversos tratamentos (revisto por [93]).

Embora tenha-se avançado bastante na compreensão da interação de DCs e linfócitos T, ainda há muitas lacunas nesse campo. É importante salientar que a diferenciação dos linfócitos Th em subtipos não é restrita aos linfócitos Th1, Th2, Th17 e Tfh, havendo um número crescente desses subtipos, os quais compreendem, até o momento, além dos quatro subtipos citados acima, células Th3, Th5, Th9, Th22 e Th25 [94]. Além desses subtipos, ainda existe a plasticidade de algumas dessas células no sentido de transformação de um subtipo em outro [95,96], o que causa confusão e controvérsia. Isso levou a propostas, como a de Tuzlak e colaboradores, que sugerem que a polarização individual das células Th em si não seria relevante. Seria necessária

a avaliação de um contexto em que a função dessas células deveria ser analisada em conjunto e em relação à função auxiliadora que desempenham, categorizando-as em termos do auxílio que fornecem aos fagócitos (tipo 1), às células B, eosinófilos e mastócitos (tipo 2) e para células de tecidos não imunes, incluindo o estroma e o epitélio (tipo 3) [94].

As respostas imunológicas têm como uma de suas características a produção de fenômenos imunopatológicos, os quais podem variar de inflamação branda a quadro graves, como na sepse. Além disso, esses fenômenos têm duração que pode ser variável, de poucos dias, como em algumas infecções virais agudas, a perpetuação das respostas, como nas autoimunidades, doenças inflamatórias crônicas e alergias. Esses espectros de sintomas correlacionam-se com a regulação das respostas imunológicas, algo que tem grande relevância clínica, posto que a manipulação e ajustes finos das respostas imunológicas possibilitariam a geração de respostas mais adequadas e, conseqüentemente, menos lesão. Dentre as células que são importantes para o controle dessas respostas, destaca-se as células Treg [97] e DCs [98], que regulam o sistema imunológico através de uma série de mecanismos e moléculas. Dentre esses, estão em evidência, nesses nos últimos anos, as proteínas de ponto de verificação (ICP - *immune checkpoint*) nas células do sistema imunológico, tais como a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CD152, CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) [99] e o receptor 1 de morte programada (PD-1 - *Programmed Cell Death 1*) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 [100]. Atualmente, inibidores de ICP hoje são vistos como imunoterápicos impressionantes, sendo muito estudado em tratamentos oncológicos [100,101].

A despeito de todos os desafios que os imunologistas enfrentam em relação à descoberta de peças importantes nesse imenso quebra-cabeça imunológico, de como essas peças se encaixam e são reguladas e como elas se correlacionam com outros componentes não imunológicos, muitos avanços são observados em diversos campos de aplicação dos conhecimentos básicos. Com o conhecimento que temos no momento, é possível estabelecer certos roteiros para o sucesso imunoterapêutico, numa combinação bem ajustada de tratamentos para criar, desviar um pouco ou modificar completamente as respostas imunológicas, estimulando-as ou suprimindo-as, procurando regular esse ajuste fino que existe entre imunidade e tolerância, tornando as respostas as adequadas por longo prazo.

4 PROGRESSOS EM IMUNOTERAPIA

Atualmente, os avanços em imunoterapia são surpreendentes, sendo representados pelo desenvolvimento de um arsenal de moléculas, células e estratégias para a "modulação" do sistema imunológico [8]. Os imunoterápicos variam bastante e sua ação pode ser ou não específica para antígeno(s) dos patógenos, alérgenos, antígenos tumorais específicos (TSA, do inglês, *tumour-specific antigen*) ou autotígenos. Independentemente de sua especificidade, devem ser desencadeadores de mudanças em uma resposta imunológica já desenvolvida, a qual se mostra inapropriada, como nas hipersensibilidades e doenças autoimunes, e/ou ineficiente para combater o agente causal da doença, quer seja células tumorais, quer seja agentes infecciosos. De uma forma genérica, alguns autores têm classificado as imunoterapias em dois tipos: estimuladora ou supressora de respostas imunológicas [1]. Na verdade, essa forma de classificar pode apresentar certos problemas porque alguns imunoterápicos, como os anticorpos, podem agir como potencializadores ou bloqueadores de respostas imunológicas, sendo agonistas ou antagonistas de receptores ou, ainda, neutralizadores de moléculas do sistema imunitário. Ademais, podem ser usados como uma resposta pré-estabelecida na forma de imunização passiva. Aqui, escolheu-se uma outra classificação, baseada na forma pela qual a resposta imunológica poderá ser "alterada", ou seja, modulação de modo específico ou inespecífico para (os) antígeno(s) relacionado(s) à doença, podendo esses serem do agente etiológico da infecção, TSA ou alérgenos.

4.1 Imunoterápicos não relacionados a antígeno(s) específicos de patógenos, TSA ou alérgenos

A alteração da resposta imunológica por esses imunoterápicos para eliminar ou melhorar os sintomas de certas doenças podem ser realizadas por diversos tipos de estratégias usando moléculas, nanopartículas ou organismos, que podem ou não ser geneticamente modificados.

4.1.1 Micro-organismos, parasitos e seus produtos

Após os trabalhos pioneiros de imunoterapia com bactérias para o tratamento de cânceres no final do século XIX, o uso de micro-organismos para esse fim ficou bastante restrito, perdendo relevância após a morte de Coley, em 1936. Nesse período,

a radioterapia tinha sido estabelecida como um tratamento para tumores e a quimioterapia vinha sendo aceita, sendo alta a esperança de que essas terapias levariam à cura desses tipos de doenças [102].

Em 1928, Pearl [103] já havia encontrado indicações de que micobactérias poderiam ser usadas como imunoterapia. Essas pistas vieram ao perceber que cânceres eram pouco frequentes quando se analisava materiais oriundos de autópsias de pacientes que morreram de tuberculose ativa. Porém, isso passou a ser uma possibilidade real apenas em 1959, quando Old e colaboradores [104] publicaram um estudo mostrando que camundongos tornavam-se mais resistentes a tumores quando infectados intravenosamente (i.v.) com a vacina que contém *M. bovis* atenuado (BCG). Alguns trabalhos com essa vacina foram feitos entre as décadas de 1960 e 1970, no entanto, foi o trabalho de Morales e colaboradores, em 1976 [105], que mostrou um efeito positivo dessa vacina no tratamento de tumores de bexiga, uma prática clínica reconhecida e usada até aos dias de hoje para esse tipo de câncer [106].

Além do tratamento com a linhagem OK-432 de *Streptococcus pyogenes*, usada como terapia alternativa para tratamento cirúrgico de linfangioma, e o BCG, como terapia complementar para câncer de bexiga, muitas estratégias usando bactérias vivas ou modificadas por engenharia genética ou componentes desses micro-organismos estão sob investigação, dadas as suas características estimuladoras do sistema imunológico. São exemplos desses estudos os testes clínicos com *Clostridium* (linhagem NT de *C. novyi*) para tratamento de tumores sólidos e *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (linhagem VNP20009) para melanomas, e as pesquisas em fase experimental com *Magnetococcus marinus* (linhagem MC1) para terapia de tumores sólidos e alguns cânceres metabólicos, e as vesículas de membrana externa (OMVs), produzidas por bactérias Gram-negativas, para tratamento de melanomas [107,108].

Muitos componentes fúngicos também têm potencial como agentes terapêuticos [109], mas, certamente, as moléculas contendo polímeros de β -1,3-glucana são as mais exploradas. Essa tendência vem desde meados do século XX, quando se observou que o zimosan, complexo proteína-carboidrato da parede de *Saccharomyces cerevisiae*, poderia estimular a defesa do hospedeiro contra sarcomas desenvolvidos experimentalmente em camundongos [110]. A partir dessa época, em uma variedade de condições, tem-se demonstrado que a terapia *in vivo* com β -glucanas potencializa as respostas imunológicas do hospedeiro, o que inclui tumores e infecções com fungos, bactérias, vírus e protozoários [111].

É interessante observar que até mesmo parasitos e seus componentes têm sido estudados como imunoterápicos. Dentre os protozoários, tem-se a linhagem CPS de *Toxoplasma gondii*, mutante do gene da carbamoil fosfato sintase e auxotrófica para uracila, para tratamento de tumores agressivos, como os cânceres de pâncreas, pulmão e ovário e melanomas. Ainda mais interessante é que os antígenos do lisado de *T. gondii*, mais seguros que o parasito vivo atenuado, podem ser usados como terapia para doenças neurodegenerativas, além de câncer [108]. Já em relação aos helmintos, há alguns já testados, bem como seus componentes, que possivelmente poderiam alterar o curso da resposta imunitária em alergias e autoimunidade [112].

Os PRRs, como descrito anteriormente neste texto, são sensores importantes para detecção de perigo por nosso sistema imunológico e o entendimento de como eles podem estimular, modificar ou reprimir uma resposta imunológica os tornam determinantes para estabelecimento de métodos profiláticos e terapêuticos para inúmeras doenças. Nos primórdios da imunoterapia, a estimulação desses PRRs se fez de modo inconsciente e empírico pelo uso de bactérias e compostos de micro-organismos, avançando-se para agonistas e antagonistas sintéticos. Quase a totalidade das respostas modificadas por esses micro-organismos ou seus componentes correlaciona-se com a estimulação de PRRs. Para BCG, por exemplo, não está claro o mecanismo pelo qual é desencadeada a resposta contra tumor de bexiga, todavia, esse depende da indução de resposta Th1 e da ação antitumoral de linfócitos T citotóxicos, células NK, macrófagos e neutrófilos [108]. Efetivamente, componentes micobacterianos podem estimular PRRs, tais como TLRs, NLRs e receptores CLR, especialmente TLR2, TLR4 e TLR9, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias [113], importantes para eliminação do tumor.

Esse exemplo acima nos dá a dimensão de quão importantes podem ser os PAMPs de micro-organismos ou seus derivados sintéticos para indução de respostas inflamatórias. Dos 10 subtipos de TLRs em seres humanos, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 são expressos na membrana plasmática celular, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, em endossomos, estando todos na forma de dímeros. TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão relacionados ao reconhecimento de ácidos nucleicos de vírus, bactérias, fungos e protozoários, TLR2, a lipopeptídeos estranhos, tais como lipoproteína associada a peptidoglicano, lipoarabinomana de micobactérias e glicoproteínas semelhantes a mucina ancoradas com glicosilfosfatidilinositol isoladas de *Trypanosoma cruzi*, TLR4, a LPS e TLR5, a flagelina de bactérias [114]. O ligante de TLR10 não é conhecido até o

momento, apesar de alguns investigadores sugerirem que possa ligar lipopeptídeos diacilados. Diferente dos outros TLRs, TLR10 têm propriedades anti-inflamatórias, abrindo perspectivas de que possa também ser explorado como alvo terapêutico [115]. TLR1 e TLR6 formam heterodímeros com TLR2, o que mostra uma complexidade de resposta de PRRs quando se avalia as interações entre esses receptores. A geração de heterodímeros de TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 parece ser um mecanismo evolutivo que ampliou o espectro de ligantes, permitindo que sejam reconhecidas diferentes estruturas de lipopeptídeos presentes em vários patógenos [116]. Os heterodímeros de TLR2 podem ainda interagir com os receptores CD14, o receptor *Scavenger* CD36 e o receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) e desencadear respostas sinérgicas. TLR4, por sua vez, forma um complexo com a proteína MD-2 para reconhecer LPS, podendo ainda ligar a proteína ligante de LPS e a CD14, o que aumenta a sensibilidade do complexo de 100 a 1.000 vezes [117]. Parece claro que os diversos tipos de PRRs se agrupam e funcionam como um aparato multicomponente para detecção de patógenos e regulação da resposta imunológica. Além dos TLRs, fazem parte desses agrupamentos os receptores de Fc de imunoglobulinas, que ao se ligarem aos anticorpos ligados a patógenos, principalmente Fc de IgG, induzem imunidade inata dependente de anticorpo [118], e os CLRs, tais como dectina-1, receptor de manose, dentre outros, que se ligam à uma variedade de estruturas de carboidratos de microorganismos [119,120]. O conhecimento das repercussões das respostas desencadeadas por esses complexos de receptores pode ter grande impacto, pois associações inesperadas podem ser usadas em imunoterapia, como por exemplo, o aumento da eficácia da imunoterapia contra o câncer baseada em anticorpos que bloqueiam receptores de ICP (CTLA-4) a partir da coativação de TLRs [101].

Um número crescente de relatos na literatura indica que células da imunidade inata podem apresentar características adaptativas, tal como uma resposta mais robusta após o segundo contato com um agente infeccioso. Esse fenômeno não é restrito a vertebrados, sendo relatado em plantas e invertebrados, os quais não tem imunidade adaptativa [121]. Em células, tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células NK, dentre outras, ocorre uma reprogramação funcional de longo prazo, que é induzida por estimuladores exógenos ou endógenos e que leva a uma mudança na resposta após um segundo desafio, retornando, posteriormente, a um estado de homeostase [122]. Por ser um processo diferente da memória imunológica, que é uma característica da imunidade adaptativa, esse foi denominado de imunidade treinada. A

resposta secundária dessas células de imunidade inata ao reestímulo inespecífico pode ser mais ou menos robusta do que a resposta primária, mostrando que há um ajuste em relação ao tempo e ao contexto. Apesar desse conceito geral, parece que a imunidade treinada é processo de adaptação a longo prazo das células de imunidade inata. Sem contar que diferentes estímulos, tais como β -glucana, LPS ou a vacina BCG podem induzir diferentes programas de imunidade treinada [121].

Uma parte significativa das definições de imunidade treinada vieram de trabalho interessantes sobre o uso do BCG em modelos experimentais, mostrando que essa vacina levou a proteção de animais contra infecções secundárias por *Candida albicans* [123], *Schistosoma mansoni* [124] e *M. tuberculosis* [125]. Em seres humanos, os dados epidemiológicos sugerem as vacinas vivas contra sarampo, varíola e poliomielite, bem como o BCG, têm efeitos inespecíficos benéficos, isto é, são protetores contra outras infecções [126]. Ademais, existem muitas evidências de que os efeitos do BCG como imunoterápico antitumoral, tais como câncer de bexiga, melanoma, leucemia e linfoma parecem ser dependentes de sua capacidade de induzir imunidade treinada em monócitos e macrófagos [127]. Um outro agente indutor de imunidade treinada interessante é o LPS. Um estudo demonstrou que essa endotoxina induz mudanças em células troncos hematopoiéticas, aumentando a capacidade de resposta de genes imunológicos associados à estimulação secundária. Essa estimulação melhorou a resposta inata contra a *Pseudomonas aeruginosa*, aparentemente por reprogramações transcriptômica, epigenética e funcional de progenitores mieloides. Curiosamente, os autores sugerem que uma função de memória integral da imunidade inata poderia ser gravada epigeneticamente a partir do histórico de infecções [128].

Posto isso, fica claro que a criação de agonistas ou antagonistas de TLRs baseados nos requisitos estruturais de ligação estabelecidos para PAMPs abre uma janela de oportunidades para síntese de novos imunoterápicos aplicáveis a inúmeras intervenções clínica. Isso já é uma realidade em moléculas como o monofosforil lipídeo A (MPLA), molécula derivada do lipídeo A do LPS, que mantém a estimulação de TLR4, porém, sem a propriedade endotóxica, e o imiquimod, ligante de TLR7, ambos licenciados para uso em seres humanos. O MPLA está mais associado a formulações vacinais, como por exemplo Fendrix, para hepatite B, e o imiquimod sendo usado para curar doenças virais [129].

4.1.2 Moléculas imunoestimuladoras

As moléculas imunoestimuladoras podem agir como agentes profiláticos ou terapêuticos. São considerados potencializadores da resistência de um organismo à infecção, estimulando a imunidade inata e/ou a adaptativa. Dentre as drogas mais usadas como estimuladores de resposta imunológica estão o levamisol, que foi sintetizado inicialmente como um anti-helmíntico, porém, restaura a função imunológica deprimida de linfócitos B, linfócitos T, monócitos e macrófagos; a talidomida, que embora seja um teratígeno que induz uma série de defeitos congênitos, diminui o TNF circulante em pacientes com eritema nodoso hansênico; a isoprinosina, que promove a produção de IL-1, IL-2 e IFN- γ e a proliferação de linfócitos em resposta a estímulos antigênicos; a imunocianina, uma forma estável de hemocianina, usada no tratamento de câncer de bexiga, resulta na maior ativação de células Th e células T citotóxicas, macrófagos e células NK; e a bestatina, um dipeptídeo [(2S, 3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil]-L-leucina que estimula ou aumenta a atividade dos linfócitos T e B [58]. De fato, essa é uma área de pesquisa contínua, havendo, atualmente, muitos compostos de plantas medicinais sendo estudados como imunoestimuladores [58,130].

4.1.3 Inibidores de ICP

As proteínas ICPs são moléculas (receptores) reguladoras do sistema imunológico que atuam como “guardiãs” das respostas imunitárias. Normalmente, esses receptores fornecem sinais inibitórios via sequência presente na porção intracelular do receptor que contém o motivo de inibição baseado em tirosina do imunorreceptor (ITIM, do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) ou o motivo interruptor baseado em tirosina do imunorreceptor (ITSM, do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*). Desempenham papéis fundamentais na prevenção de doenças autoimune através da regulação de respostas dos linfócitos. Curiosamente, os linfócitos T intratumorais apresentam essas proteínas, o que resulta em exaustão dessas células, podendo esse estado ser revertido com o bloqueio desses receptores. As moléculas de ICPs também são altamente expressas em linfócitos Tregs e usadas em um dos mecanismos que esses linfócitos usam para suprimirem de células T efectoras [131].

Terapias com anticorpos antagonistas têm sido desenvolvidas, promovendo o impedimento estérico da associação do ligante com essas proteínas ICPs, bloqueando

assim a inibição das respostas imunológicas [131,132]. Embora tenham sido descritos alguns receptores de ICPs na superfície de linfócitos, tais como CTLA-4, PD-1, gene 3 de ativação de linfócitos (CD223 ou LAG3, do inglês, *Lymphocyte-activation gene 3*), proteína 3 contendo domínios mucina e imunoglobulina de célula T (TIM3, do inglês, *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*), imunorreceptor de células T com domínios imunoglobulinas e ITIM (TIGIT do inglês, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) e atenuador de linfócitos T e B (BTLA do inglês, *B and T lymphocyte attenuator*), até o momento, os tratamentos que visam o bloqueio de PD-1/PD-L1 foram os mais bem-sucedidos [131]. O bloqueio de CTLA-4 tem sido testado clinicamente com os mAbs antagonistas Ipilimumab e Tremelimumab para tratamento de melanoma, sendo o primeiro liberado para uso pela agência federal reguladora do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) [133]. Já para PD-1/PD-L1, existem cinco anticorpos antagonistas (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Nivolumab e Pembrolizumab) aprovados pelo FDA para tratar uma ampla variedade de tipos de cânceres. De um modo interessante, a terapia de bloqueio de receptores de ICP, em geral, leva a uma resposta mais duradoura do que a quimioterapia ou terapias direcionadas, o que remete à indução da memória imunológica [132].

Apesar de a liberação de resposta imunológica no microambiente tumoral ter efeitos benéficos, o que pesa favoravelmente na balança, deve ser mencionado que ao diminuir a regulação de resposta contra autoantígenos, esse tratamento pode induzir efeitos colaterais graves, principalmente, fenômenos autoimunes. Apesar de todos os progressos feitos nessa área, pesquisas sobre a regulação da resposta imunológica ainda são imprescindíveis para se obter melhores marcadores, aumentar o rol de cânceres tratáveis por esse tipo de tratamento e diminuir as reações autoimunes decorrentes desses tipos de imunoterapia [131,132].

4.1.4 Moléculas imunossupressoras

As respostas imunológicas antiautoantígenos, que aparecem naturalmente ou decorrentes dos tratamentos que usam o bloqueio de moléculas de ICP, e antiautoantígenos, após o transplante de órgãos, necessitam ser manipuladas com cuidado para evitar risco de lesões graves, pois a imunossupressão aumenta o risco de infecção e câncer, consistindo em um ajuste fino que é difícil de ser obtido. Assim, desenvolveu-se uma estrutura conceitual de todos os elementos que contribuem para

o risco infeccioso, denominado de “imunossupressão líquida” (tradução livre do inglês, *net state of immunosuppression*), possibilitando uma adequação melhor nas terapias e, conseqüentemente, nos seus resultados. Além disso, existem desafios em se manipular as respostas inflamatórias graves em doenças como sepse e COVID-19, dentre outras. Dentre os tratamentos mais usados, temos [58,134,135]:

- Glicocorticoides: ligam-se a seu receptor, bloqueando direta ou indiretamente fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação de genes pró-inflamatórios. Assim, sua ação gera variações na liberação de citocinas inflamatórias e sinalização celular, determinando suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras.
- Azatioprina: esse composto é metabolizado em 6-mercaptopurina, resultando em 6-metil-mercaptopurina e 6-tioguanina, as quais são incorporadas ao DNA das células em divisão. Também bloqueia a síntese de purina. Como consequência inibe a proliferação de linfócitos T e B, dentre outras células.
- Ciclofosfamida: é uma pró-droga antineoplásica metabolizada pelas enzimas P450 em um metabólito ativo, a mostarda de fosforamida, que alquila DNA. Essa reação gera mutação e fragmentação do DNA e morte celular. Não é específica, por isso, pode atuar sobre outras células produzindo leucopenia, esterilidade, cistite hemorrágica e tumorigênese.
- Metotrexato: inibe a enzima diidrofolato redutase, acumulando folatos oxidados inativos e, assim, bloqueia a síntese de nucleotídeos, matando as células na fase de síntese de DNA (S).
- Inibidor da calcineurina: a calcineurina é uma fosfatase de serina-treonina que controla a atividade do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), que é necessário para ativação de células T e expressão de IL-2 no início das respostas imunológicas. Os inibidores, tais como ciclosporina e tacrolimo, se ligam a imunofilinas e bloqueiam o efeito de calcineurina e, por conseguinte, reduzem a produção de interleucina-2 e proliferação de células T, propiciando a imunossupressão.
- Inibidor mTOR: Os inibidores, tal como sirolimo, se ligam a imunofilina FKBP12 e inibem o mTOR, uma proteína quinase responsável pela progressão do ciclo celular, suprimindo a proliferação de linfócitos T.
- Micofenolato de mofetila: inibe a inosina-5'-monofosfato desidrogenase, resultando no comprometimento da síntese de purina, com amplos efeitos nas células T, células B, DCs, monócitos e macrófagos.

- **Imunoglobulina antitimócito:** gamaglobulina de soro de coelhos imunizados com timócitos humanos. O soro antitimócitos contém anticorpos ativadores do sistema complemento (líticos) que se ligam a CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, CD44, CD45 e moléculas de HLA de classe I e II, expressas na superfície do linfócito T. Reduz o número de linfócitos circulantes por aglutinação ou lise.
- **Bloqueadores de coestimulação:** como descrito anteriormente, a resposta imunológica necessita de três sinais. Os anticorpos ou receptores solúveis direcionados a moléculas responsáveis pelo segundo sinal potencialmente podem ser usadas como agentes terapêuticos. O Abatecept e Belatacept são bons exemplos desses tipos de imunossuppressores liberados para uso em seres humano, constituindo-se proteínas solúveis produzida pela fusão do CTLA-4 com a região Fc de IgG. Essas moléculas bloqueiam o segundo sinal de ativação dos linfócitos T, impedindo a ligação de CD28 a CD80/CD86. Além de impedir a coestimulação, podem induzir anergia em linfócitos T por ausência de segundo sinal.
- **Alemtuzumab, Basiliximab e Rituximab:** ligam aos receptores celulares CD25 (cadeia α do receptor de IL-2), CD52 (presente em 95% das células T periféricas) e CD20, respectivamente. Basiliximab inibe a proliferação de células T dependente de IL-2. Alemtuzumab leva a depletação de linfócitos T e B enquanto Rituximab induz a lise apenas de linfócitos B.
- **Eculizumab e Tocilizumab:** O primeiro leva ao bloqueio da formação do complexo de ataque à membrana do sistema complemento por impedir a clivagem de C5 em C5a e C5b.
- **Bloqueadores de citocinas:** são proteínas de fusão ou mAbs que bloqueia citocinas, sendo mais comuns o bloqueio de citocinas inflamatórias. Diminuem os efeitos dessas moléculas em doenças inflamatórias crônicas, incluindo as autoimunes. Entre os mAbs se destacam Adalimumab, Certolizumab pegol (Fab peguilado), Infliximab e Golimumab para bloqueio de uma das citocinas inflamatórias mais importantes, o TNF; Tocilizumab, que se liga ao receptor de IL-6, inibindo assim a ação da citocina inflamatória multifuncional IL-6; e Denosumab para bloqueio do ligante do receptor ativador do fator nuclear capa B (RANKL, do inglês, *receptor activator of NF- κ B ligand*), impedindo a ativação de fibroblastos sinoviais envolvidos na reabsorção óssea. Os bloqueios também podem ser feitos com proteínas recombinantes, tais como Anakinra, uma proteína recombinante solúvel antagonista do receptor de IL-1, e Etanercept, proteína recombinante solúvel

produzida pela fusão do receptor de TNF com a região Fc de IgG, tendo como finalidade bloquear TNF.

4.1.5 Terapia com imunoglobulina intravenosa (IVIg)

As imunoglobulinas ou anticorpos podem ser usados para transferir proteção, como demonstrado no final do século XIX, por Behring e Kitasato [25,28]. Algo diferente foi feito com essas moléculas, em 1952, quando Ogden Carr Bruton (1908-2003) tratou um paciente com agamaglobulinemia com uma preparação fracionada do sangue de indivíduos saudáveis segundo a técnica de Edwin Joseph Cohn (1892-1953) [136]. As preparações de IVIg consistem em um concentrado de imunoglobulinas derivado de 1.000 a 100.000 doadores saudáveis [137]. Além de suplementação em imunodeficiências, a IVIg foi testada em outras patologias. De fato, houve um resultado incrível quando uma dose quatro vezes maior que a dose de suplementação foi testada em paciente com púrpura trombocitopênica idiopática [138]. Após esse achado, as propriedades anti-inflamatórias da IVIg têm sido cada vez mais exploradas para tratar muitas doenças autoimunes e sistêmicas. O que varia nesses tratamentos é a dose aplicada, onde baixa dose de IVIg serve para reposição passiva de imunoglobulinas em imunodeficiências enquanto altas doses propiciam uma atividade anti-inflamatória [137]. Hoje, as IVIg são indicadas em duas situações principais: (1) terapia de reposição em imunodeficiências primárias ou secundárias ou (2) imunomodulação, tais como púrpura trombocitopênica idiopática, síndrome de Guillain-Barré (GBS), polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica e doença de Kawasaki. [136]. Há também recomendação de uso *off-label* em doenças infecciosas com inflamação grave, como sepse [139] e COVID-19[140].

4.1.6 Terapia com citocinas

As citocinas são moléculas solúveis que fazem comunicação intercelular, sendo responsáveis pela homeostase do nosso organismo. No sistema imunológico, a expressão alterada dessas moléculas ou a desregulação das vias intracelulares que promovem a homeostase induz a distúrbios autoimunes, inflamação crônica e malignidades. Assim, a terapia com citocina visa manipular o sistema imunológico a fim de restaurar ou bloquear a atividade dessas moléculas para tratar a doença. O direcionamento terapêutico dessas moléculas ou de seus receptores levaria ao tratamento de condições inflamatórias, distúrbios relacionados ao sistema

imunológico e malignidades. São exemplos desse tipo de imunoterapia o aumento do estado antiviral desencadeado pelo tratamento com IFN do tipo I, os ensaios clínicos com IL-2 e IFN- γ para o tratamento de infecções micobacterianas [141], IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IFN- α , TNF, fator β de transformação do crescimento (TGF- β , do inglês, *transforming growth factor*), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e fator 1 estimulador de colônia (CSF-1, do inglês, *colony-stimulating factor-1*), bem como e outras citocinas que promovem a produção ou estimulação de células mieloides, para o tratamento de cânceres [142].

4.2 Imunoterápicos relacionados a antígeno(s) específicos de patógenos, TSA ou alérgenos

Dentre as imunoterapias direcionadas aos antígenos diretamente relacionados às doenças, constam as imunoterapias passivas e imunoterapias ativas.

4.2.1 Imunoterapia passiva

Previamente, imunização passiva ou imunoterapia passiva referia-se à transferência de anticorpos para um indivíduo desprotegido para a prevenção ou tratamento da doença. Desde as propostas iniciais de uso desse procedimento terapêutico por Behringer, Kitasato e Ehrlich, a técnica tem avançado, embora ainda se utilize a mesma base racional descrita há cerca de 130 anos [143]. Atualmente, o termo se expandiu para albergar a terapia de transferência passiva de células imunitárias circulantes maduras, das quais células do sistema imunológico transformadas geneticamente são as mais utilizadas [144]. Anticorpos e essas células são produzidas *ex vivo*, em algumas situações manipulados, e transferidos para os indivíduos aos quais se quer proteger.

4.2.1.1 Imunoterapia com anticorpos policlonais

Essa imunização é necessária quando o paciente apresenta deficiência de anticorpos, tais como nas imunodeficiências congênitas e adquiridas, ou quando há necessidade de uma resposta instantânea. Em muitas dessas situações, a ação da(s) entidade(s) ou molécula(s) patogênica(s) é muito rápida, sendo o tempo um elemento vital para bloqueá-las ou neutralizá-las. Há também situações, tal como para o sistema

Rh, onde há a necessidade de imunossupressão de resposta, com a destruição do alvo antes que o sistema imunológico monte uma resposta [145].

Atualmente, uma série de anticorpos policlonais estão licenciados para uso para neutralizar agentes infecciosos ou suas toxinas, tais como os vírus da hepatite A e B, sarampo, varicela, varíola, raiva e rubéola, tratamento do botulismo infantil (*C. botulinum* do tipo A ou B), contra infecção pós-inalação com *Bacillus anthracis* (antraz), difteria e tétano. Também estão disponíveis antissoros para neutralizar peçonhas de diversos animais – serpentes, aranhas, escorpiões, carrapatos, água viva e lagarta do gênero *Lonomia*; para imunização passiva de gestantes Rh negativo com imunoglobulina antiantígeno D, prevenindo a sensibilização ao antígeno Rh no momento do parto; para tratamento de alergias; e contra intoxicação com digoxina [143,145–147].

4.2.1.2 Terapia baseada em mAb antimolécula(s) específica(s) de patógenos, TSA ou alérgenos

Além dos usos dos anticorpos como agonista de receptores ou bloqueadores de moléculas do sistema imunológico, como descrito anteriormente, essas proteínas podem ser usadas contra patógenos ou células cancerosas de várias maneiras, tais como citotoxicidade dependente do sistema complemento, opsonização, aglutinação, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) a partir de macrófagos, células NK ou eosinófilos, liberação de drogas ligadas covalentemente a anticorpos específicos para células que se quer destruir (“balas mágicas”) e aproximação de células B ou T citotóxicas a células cancerosas por mAb biespecíficos (BsmAb). Esses BsmAbs são produzidos com dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab, do inglês, *fragment antigen binding*) com especificidades diferentes – uma para o antígeno na célula cancerosa e outro para o local de ativação dos linfócitos, geralmente, CD3 para células T e CD19 para células B [148,149]. Além disso, os mAb podem agir neutralizando agentes patogênicos, tais como o Palivizumab para prevenção em crianças com alto risco para doença do trato respiratório inferior causada pelo vírus sincicial respiratório (RSV) e Raxibacumab e tratamento do antraz por inalação [143], para bloquear alérgenos, tal como o Fel d 1 de gatos [147], bem como lisar células que apresentam TSA, uma das estratégias mais bem-sucedidas na terapia do câncer. De um modo fascinante, em alguns casos, a lise induzida por mAb de células tumorais pode gerar uma resposta imunológica

adaptativa, aumentando a captação de antígenos tumorais e a apresentação cruzada por DCs [150].

4.2.1.3 Ativação de linfócitos T citotóxicos

Diferente dos linfócitos Th, que coordenam as respostas imunitárias, os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), como o próprio nome diz, são células que executam uma função imunológica muito relevante – atacam e matam células-alvo. Esses linfócitos se ligam às células-alvo, tais como células cancerosas ou células infectadas por vírus, por seus TCRs, que reconhecem peptídeos estranhos apresentados por moléculas do MHC de classe I, as quais estão presentes em todas as células nucleadas de nosso organismo. Assim, as células T citotóxicas tem um papel importante na vigilância imunológica, possibilitando a eliminação de células infectadas e células cancerosas, através do reconhecimento de peptídeo estranho + moléculas do MHC de classe I. Aqui volta a cena, novamente, os BsmAb que, como descrito acima, ligam-se à célula cancerosa e à célula T citotóxica, ativando tais linfócitos bem próximo da célula alvo.

4.2.1.4 Terapia com células que expressam receptor antigênico quimérico (CAR)

As células T, NKT e NK são importantes para combater tumores e agentes patogênicos. No entanto, são células que necessitam de múltiplos sinais para atuarem. Para se obter um reconhecimento mais direto, foi desenvolvido um transgene para receptor quimérico antígeno-específico, inicialmente expresso em células de linfoma de células T de camundongo [151], sendo posteriormente produzidos em células T, NKT e NK e macrófagos humanos [152]. Esses CARs são constituídos de três partes: um domínio extracelular, que compreende um espaçador e um fragmento variável de imunoglobulina em uma cadeia única (scFv, do inglês, *single-chain variable fragment*) específico ao antígeno, um domínio transmembrana e um domínio intracelular com domínios de ativação e de coestimulação de células T, os quais contêm motivos de ativação baseado em tirosina do imunorreceptor (ITAM, do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) [153]. Desde o desenvolvimento da primeira geração de receptores, a partir de 1987 [151], a maioria das células contendo CAR foi produzida para uma ação antitumoral. As gerações são diferenciadas pela constituição do domínio intracelular, isso porque ao reconhecer o antígeno pelo

domínio scFv, o CAR deve sinalizar de maneira eficiente para que a células desempenhe a função esperada [152].

A região intracelular dos primeiros tipos de CARs foram desenhadas com apenas uma porção sinalizadora da cadeia ζ do complexo CD3. Por apresentar sinalização, durabilidade e eficácia antitumoral *in vivo* insuficientes, a primeira versão foi usada como plataforma para a engenharia de outros domínios intracelulares do CAR [153]. Os CARs da segunda geração apresentavam em sua região intracelular, além do domínio de CD3 ζ , um domínio coestimulador do CD28 ou do receptor 4-1BB (CD137). Houve uma melhora substancial nas células T que expressavam esses CAR em termos de persistência das células, secreção de citocinas e eficácia antitumoral em modelos animais e, de forma mais importante, uma expressiva ação antitumoral em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células B e linfoma difuso de grandes células B, um tipo linfoma não Hodgkin. A fim de aumentar a produção de citocinas, a capacidade antitumoral e a proliferação das células T, foi criada a terceira geração de CARs, a qual apresentava vários domínios intracelulares de receptores coestimuladores, como CD28-4-1BB ou CD28-OX40. Além das modificações dos CARs da terceira geração, na quarta geração, também conhecida como TRUCK, foram feitas as incorporações de transgenes nas células para liberação de citocinas e expressão de ligantes de coestimuladores. Na mais recente geração de CARs, adicionou-se um domínio intracelular extra, na forma de domínio intracelular truncado de receptor de citocina, como por exemplo, fragmento da cadeia do receptor de IL-2 com um motivo para fatores de transcrição de ligação, como STAT-3/5. Esse sinal permite que as células T CAR permaneçam ativas e possam gerar células T de memória [154].

Mais do que uma promessa, a imunoterapia com células CAR já é uma realidade, sendo liberado para o tratamento de pacientes com (a) leucemia linfoblástica aguda, feito com o imunoterápico Tisagenlecleucel-T, (b) mieloma múltiplo recidivante ou refratário com Idecabtagene vicleucel, (c) linfoma de grandes células B recidivante dentre outros linfomas com Lisocabtagene maraleucel, (d) mieloma múltiplo com Ciltacabtagene autoleucel, (e) linfoma de células do manto recidivante ou refratário e leucemia linfoblástica aguda precursora de células B com Brexucabtagene autoleucel e pacientes com alguns tipos de linfoma que não responderam ou tiveram recaída após duas ou mais linhas de terapia sistêmica com Axicabtagene ciloleucel [155].

Além do uso em oncologia, as células CAR também estão sendo avaliadas para tratamento de outras doenças, tais como infecções com o vírus da imunodeficiência

humana, da hepatite B e C, o citomegalovírus humano, o vírus Epstein-Barr e o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave [154], bem como infecções fúngicas invasivas oportunistas por *Aspergillus* spp. [156]. Assim, observa-se que as terapias baseadas em células T CAR é uma estratégia promissora e que tem um grande potencial para ser aplicada a uma ampla gama de doenças.

4.2.2 Imunoterapia ativa

A imunização terapêutica ou imunoterapia ativa é um processo de indução de resposta imunológica antígeno-específica no paciente, levando ao desencadeamento de respostas efetoras celulares e humorais. Dentre esses tratamentos, incluem-se as que se administram células que poderão modificar a resposta imunológica pós-exposição ao antígeno.

É interessante observar que algumas definições em imunologia têm mudado com o tempo. Vacinação, por exemplo, ficou durante muito tempo restrita ao sentido de profilaxia, sendo administradas a indivíduos saudáveis para prevenir uma doença. Porém, percebeu-se que algumas preparações vacinais poderiam ser terapêuticas, uma vez que eliminam ou aliviam sintomas daqueles que já estavam doentes. É bastante evidente que, atualmente, existe um grande esforço para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra diversos tipos de doenças, tais como cânceres, doenças infecciosas, alergias e doenças autoimunes [157]. A composição dessas preparações terapêuticas pode ser bastante similar à das vacinas profiláticas [158], podendo ser compostas por antígenos bastante variados, tais como entidades patogênicas (vírus, bactérias ou leveduras) naturais ou geneticamente projetadas, atenuadas ou inativadas; peptídeos/proteínas naturais ou modificadas ou ácidos nucleicos copiados do material genéticos desses agentes (RNAm ou DNA); partículas similares a vírus e vesículas membranosas; e vacinas vetorizadas [157]. É claro que não poderia ser deixado de lado um tipo de tratamento promissor que é considerado um tipo de vacina terapêutica, as DCs geneticamente projetadas ou pulsadas com TSA ou proteínas de agentes infecciosos [93,159]. A invenção dessas vacinas decorre da percepção de que as DCs têm um papel fundamental na organização das respostas imunológicas [160]. De um modo geral, esse tipo especial de vacina pode ser produzido, basicamente, por dois tipos de metodologias. No primeiro, as DCs são obtidas a partir de monócitos isolados do indivíduo a ser tratado (células autólogas do paciente), pulsadas com o antígeno, amadurecidas *in vitro* e infundidas no paciente. No segundo tipo, direciona-se o

antígeno às DCs *in vivo*. Para tanto, antes de ser injetado, esse antígeno é conjugado a anticorpos direcionados a receptores específicos de DCs ou ligantes desses receptores. Ao se ligar a esses receptores *in vivo*, o conjugado antígeno-ligante é endocitado, processado e apresentado pelas DCs aos linfócitos T [161,162]. Dessas vacinas terapêuticas, a Sipuleucel-T é a única liberada pelo FDA nos EUA, sendo usada para tratar o adenocarcinoma da próstata [161,163].

Dentre as vacinas terapêuticas licenciadas para uso em seres humanos, as destinadas para tratamento de alergias são as mais antigas e bem-sucedidas. Desde o estudo seminal de Noon, em 1911, no qual mostrou a atenuação dos sintomas da polinose em indivíduos injetados com extrato de pólen [6], muitas vacinas para processos alérgicos têm sido descritas. São recomendadas para pacientes com alergias que resultam em rinite, conjuntivite, asma, sendo decorrentes da sensibilização com pólen, pelos de gato, ácaros, antígenos de baratas e fungos, bem como reações à peçonha de himenópteros [31,164]. O mecanismo de ação das vacinas injetáveis está bem estabelecido e consiste na indução de anticorpos IgG específicos para alérgenos que competem com as IgE pelos antígenos. Essas IgE causam hipersensibilidade imediata por estarem associadas a receptores de Fcε na superfície de mastócitos, e quando duas dessas IgE se ligam aos epítomos de um mesmo alérgeno, aproximam tais receptores, o que dispara reações em cascata, induzindo a desgranulação dessas células e, por conseguinte, a liberação de mediadores farmacologicamente ativos. Assim, as IgG produzidas em resposta à vacina terapêutica promovem o "bloqueio de anticorpos indutores de alergia". Em apicultores tolerantes à peçonha de abelhas e pacientes que receberam a vacina, foi visto que há a ativação de células B reguladoras específicas de alérgenos que secretam IL-10. Assim, suprimem subtipos de células Th específicas para os alérgenos e induzem a produção de IgG4 específicas para alérgenos. Apesar do relativo sucesso, essa é uma área de intensa pesquisa, com pesquisas de novas abordagens, como o uso de extratos de alérgenos hidrolisados, novos adjuvantes, alérgenos recombinantes, peptídeos contendo epítomo de células T, alérgenos acoplados a compostos imunomoduladores ou a partículas semelhantes a vírus, ácidos nucleicos que codificam alérgenos, peptídeos de epítomo de células B ligadas a um carreador e variação nas rotas de administração das vacinas [31].

As vacinas terapêuticas contra o câncer são vistas como uma grande promessa há anos e alvo de intensa pesquisa em todo o mundo. Essas vacinas terapêuticas visam induzir a regressão do tumor, erradicar a doença residual mínima, estabelecer

memória imunológica aos antígenos tumorais e evitar reações não específicas ou adversas. Elas são constituídas de antígenos tumorais selecionados e adjuvantes que ativam as células dendríticas. Os princípios fundamentais necessários para uma vacinação terapêutica bem-sucedida, basicamente, são os mesmos vistos em outras vacinas, isto é, a entrega de grandes quantidades de um antígeno de alta qualidade às DCs, ativação ideal de DCs, estimulação adequada de células Th e células T citotóxicas. Além disso, as células efetadoras da resposta imunológica devem infiltrar no microambiente tumoral e possibilitar que a resposta seja sustentada e mantida por determinado tempo [165]. Apesar de todos os avanços em termos de vacinologia nos últimos anos, a única vacina terapêutica liberada para uso é a Sipuleucel-T [161,163]. Na verdade, o fundamento para os insucessos com essas vacinas em desenvolvimento advém da imunossupressão e imunorresistência induzidas no microambiente tumoral. Nesse sentido, parece razoável supor que o sucesso desse método de imunização passe pela combinação dessas vacinas com tratamentos que revertam a imunossupressão imposta pelo tumor, bem como terapias tradicionais do câncer (quimioterapia e radioterapia) [166]. Além disso, poderiam ser usadas novas tecnologias para desenvolvimentos adicionais, tais como produzir novos antígenos e melhorar a qualidade dos existentes, bem como desenvolver neoepítomos, usar vacinas de antígeno compartilhado, vacinas de lisado inteiro e vacinas *in situ*. Deve-se destacar a importância do modo de entrega dos antígenos vacinais, o que pode ser feito diretamente na forma de vacinas peptídicas, de RNAm ou de DNA. Apesar de todos os reveses, as vacinas terapêuticas contra diversos tipos de cânceres são promissoras, necessitando ainda se determinar para os diversos tipos dessas patologias, os esquemas vacinais relacionados ao tempo, à sequência e à dosagem de cada componente, sendo que muitas vezes isso necessitará de customização, tendo em vista características individuais dos pacientes [165].

Em relação às doenças infecciosas, o número crescente de pacientes com doenças crônicas e o surgimento de resistência a antibióticos tornam premente o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra vários agentes patogênicos. Essas vacinas terapêuticas são vantajosas por induzirem respostas altamente específicas, terem poucos efeitos colaterais e seus efeitos serem duradouros [167]. No momento, há inúmeras vacinas terapêuticas contra doenças infecciosas em estudo, tais como HIV/AIDS, hepatite B e C, verrugas genitais (HPV), COVID-19 [157], doenças fúngicas [168], tuberculose, calazar e malária [168].

No caso das doenças autoimunes, assim como nas alergias, essas terapias visam regular a resposta imunológica, como acontece no caso da esclerose múltipla tratada com o copolímero 1 (acetato de glatiramer). Como ocorre em muitas descobertas, a desse copolímero aconteceu de um modo fortuito. As pesquisas iniciais eram sobre propriedades imunológicas de polímeros e copolímeros sintéticos em encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo experimental para esclerose múltipla. No entanto, foi notado que nenhum dos polipeptídeos baseados na estrutura primária da proteína básica de mielina, alvo da resposta imunológica nessa doença autoimune, era encefalitogênico. E foi espantoso observar que alguns desses polímeros eram protetores [169]. De todas as moléculas testadas, o copolímero 1, composto por L-alanina, L-lisina, ácido L-glutâmico e L-tirosina, foi o que teve o melhor resultado, diminuindo os sintomas da EAE em camundongos, sendo também eficaz em outros modelos dessa doença, inclusive em primatas [170]. Extensos ensaios clínicos permitiram que esse produto pudesse ser liberado para uso em pacientes com esclerose múltipla e na sua fase inicial com sintomas de surto-remissão [170]. Os mecanismos de ação desse copolímero 1 são relativamente complexos e envolvem a alteração da resposta imunitária inata, competição em moléculas do MHC, antagonismo ao TCR, desvio de resposta imunológica, produção de citocinas anti-inflamatórias, dentre outros. Essa descoberta abriu perspectivas interessantes no sentido de se descobrir vacinas terapêuticas contra outras doenças autoimunes, tais como miastenia gravis, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide [171].

5 IMUNOTERAPIA NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

5.1 Porque imunoterapia para doenças fúngicas?

As infecções fúngicas causam doenças que podem variar bastante quanto à gravidade – de infecções mucocutâneas assintomáticas ou micoses leves a infecções sistêmicas potencialmente fatais. Estima-se que globalmente existam quase um bilhão de pessoas com micoses superficiais, dezenas de milhões com candidíase mucosa e mais de 150 milhões de pessoas com doenças fúngicas graves. Além disso, mais de 1,5 milhão de pessoas morrem ou tem mortalidade associada a doenças fúngicas invasivas. Baseado nesses dados, parece claro que se deve investir em vacinas para algumas dessas doenças ou em vacinas panfúngicas [172]. Contudo, além do desenvolvimento

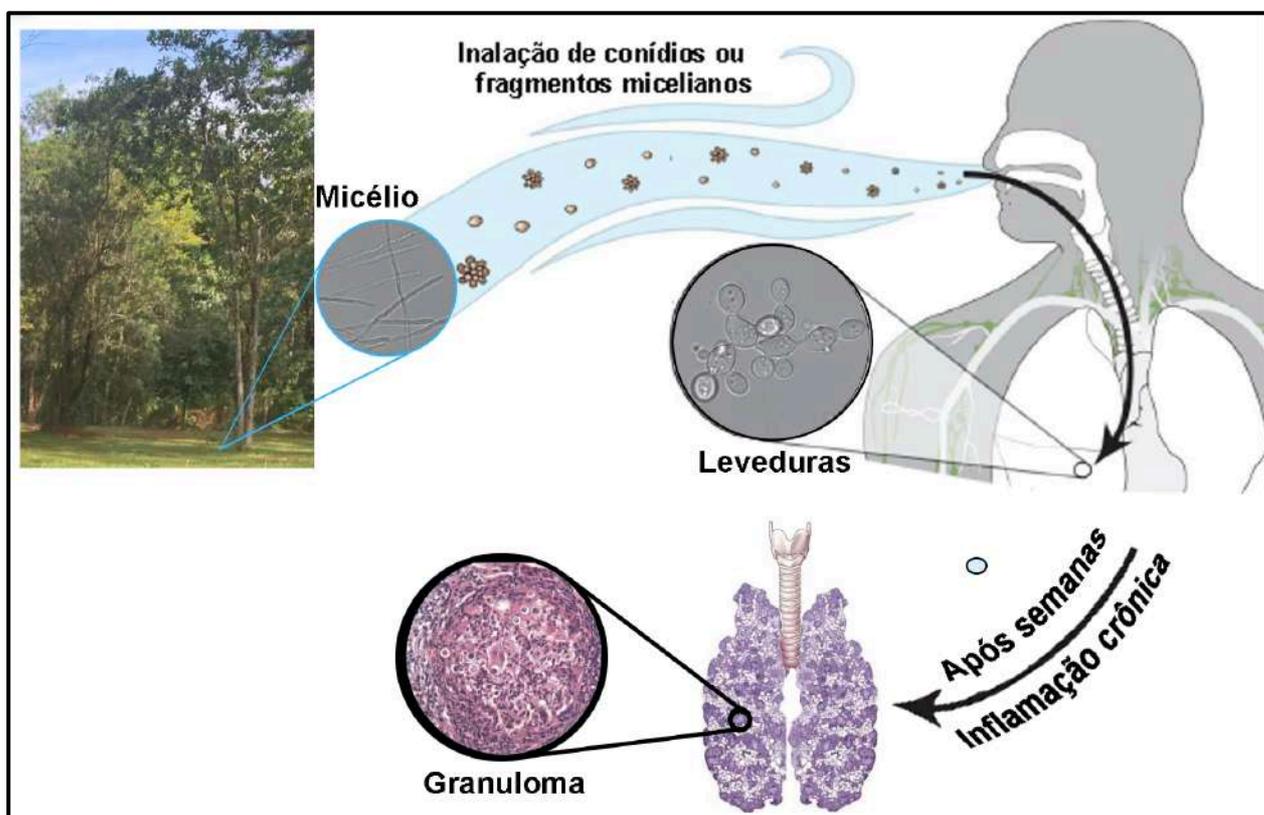
dessas vacinas não ser exequível a curto prazo, deve-se levar em consideração que apesar de algumas dessas micoses profundas serem endêmicas em determinadas regiões, como é caso da PCM, talvez isso *per se* não justifique o desenvolvimento de uma vacina a ser aplicada na população dessas áreas endêmicas. Seria difícil decidir em que situação tal esquema de proteção seria factível. Essa decisão seria bem mais fácil se a estratégia fosse imunoterápica. A descoberta e o desenvolvimento de imunoterápicos que poderiam modificar a resposta imunológica do indivíduo infectado é alternativa viável para o tratamento de micoses graves, tal como a PCM, tornando possível a complementação de terapia com antimicóticos, o tratamento de infecções por fungos resistente às drogas, diminuição do tempo de tratamento e prevenção de recidivas.

5.2 A PCM

A micose profunda conhecida atualmente por PCM é caracterizada por uma inflamação crônico-granulomatosa que acomete principalmente os pulmões (Esquema 1), podendo também ser encontrada na mucosa, pele, dentre outros órgãos [173]. Essa micose foi descrita em 1908, por Adolpho Lutz (1855-1940) [174], sendo relatados novos casos da doença em 1912, por Alfonso Splendore (1871-1953), que fez diversas análises do agente causal, inclusive da morfologia desse fungo, o qual denominou de *Zymonema brasiliense* [175]. Logo após a doença foi chamada de blastomicose brasileira e, por existirem casos da doença em outros países da América do Sul, blastomicose sul-americana, sendo o agente etiológico chamado por alguns de *Blastomyces brasiliensis*. Apesar do fungo ter sido renomeado, em 1930, de *Z. brasiliense* para *Paracoccidioides brasiliensis*, por Floriano Paulo de Almeida (1898-1977) [176], essa denominação do fungo e da PCM vieram a ser consolidadas apenas no início da década de 1970, no Simpósio de Paracoccidioidomicose que ocorreu em Medellín, na Colômbia [177].

Até o início dos anos 2000s, *P. brasiliensis* era a única espécie conhecida do gênero *Paracoccidioides*. No entanto, novas abordagens e análises de taxonomia molecular em 63 isolados de *P. brasiliensis* demonstraram que existiam três espécies filogenéticas dentro desse grupo, denominadas de S1, PS2 e PS3 [178]. Em 2008, um outro estudo mostrou que o isolado Pbo1 era divergente em relação a essas três espécies relatadas do complexo *P. brasiliensis* [179]. Análises posteriores definiram que o isolado Pbo1 e outros similares compreendiam uma nova espécie filogenética,

sendo denominada de *P. lutzii* [180]. Uma quinta, espécie, a quarta do complexo *P. brasiliensis*, PS4, foi descrita posteriormente [180,181]. Uma nova avaliação com comparação das características das espécies dentro do gênero *Paracoccidioides*, feita por Turissini e colaboradores (2017) [182], mostrou o relacionamento genealógico e expandiu as descrições dessas espécies filogenéticas, tal como as diferenças na morfologia das leveduras. Baseado nos resultados, os autores propuseram que PS2, PS3 e PS4 sejam reconhecidas taxonomicamente como três novas espécies do gênero, sugerindo que fossem nomeadas, respectivamente, como *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*. Desse modo, *P. brasiliensis* passou a ser restrito apenas à espécie S1.



Esquema 1. Processo de infecção de seres humanos por fungos do gênero *Paracoccidioides*. Parte da figura foi adaptada do material *Biology of Histoplasmosis* do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA (<http://ldepthhealth.blogspot.com/2019/06/ldh-cdc-partner-up-on-histoplasmosis.html>).

Paracoccidioides é um gênero de fungo cujas espécies são edáficas, crescendo na forma filamentosa ou miceliana (hifas), uma forma de vida saprofítica, à temperatura ambiente, de onde liberam propágulos infectantes (conídios). Esses fungos apresentam dimorfismo térmico, pois quando os propágulos são inalados por mamíferos, dentre eles os seres humanos, a temperatura corpórea induz a

transformação do micélio em leveduras, a forma parasitária do fungo, produzindo uma infecção primária (Esquema 1) [183,184].

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são autóctones da América Latina, o que explica a PCM ser endêmica nessa região geográfica, principalmente na América do Sul. Essa doença tem grande impacto médico e social nas áreas de alta endemicidade, devido ao número de casos crônicos, tratamento de longa duração e frequentes sequelas incapacitantes. A ação para o controle desse problema de saúde pública, como em muitas outras doenças, depende da obtenção de dados epidemiológicos confiáveis. No entanto, a obtenção desses é dificultada pela impossibilidade de reconhecimento de uma infecção recentemente adquirida, ausência de epidemias, deficiência na capacidade de diagnóstico em áreas endêmicas, bem como a falta de notificação de casos, o que possibilita apenas que seja presumido o número de casos [185]. Estima-se que cerca de 80% dos casos de PCM estejam no Brasil e a maioria dos demais casos na Colômbia, Venezuela, Argentina e Equador [186]. Entre 1996 e 2006, no Brasil, foram registradas 168 mortes anuais devido à PCM [187] e com base na taxa de letalidade dessa doença, entre 3% e 5%, provavelmente, o número de casos novos da PCM no Brasil está entre 3.360 e 5.600 por ano [186].

Os pacientes com PCM podem apresentar manifestações clínicas bastante diversas, no entanto, a classificação é restrita basicamente a duas formas principais: a aguda ou subaguda, também chamada tipo juvenil, e a crônica ou tipo adulto. Em crianças e adolescentes ocorre, normalmente, a forma aguda, sem prevalência dependente de gênero. Essa forma da doença se desenvolve em um período relativamente curto, sendo mais grave que a forma crônica e com significativa taxa de mortalidade [183,188,189]. Já a forma crônica é relatada geralmente em homens adultos e compreende aproximadamente 90% dos casos de PCM [183,188,189]. Essa associação da doença com o gênero masculino ocorre porque após a puberdade as mulheres tornam-se mais resistentes à doença. Parece haver uma associação entre o hormônio feminino 17- β -estradiol e a inibição da transição da forma saprofítica de *Paracoccidioides* spp., micélio, para forma parasitária, levedura, o que foi mostrado experimentalmente *in vitro* [190,191] e *in vivo* em camundongos [191]. Esse processo de inibição via 17- β -estradiol parece ser decorrente da supressão de genes sinalizadores do fungo que regulam o dimorfismo de *Paracoccidioides* spp. [192].

O dimorfismo de *Paracoccidioides* spp. tem uma forte correlação com polissacarídeos da parede celular do fungo, especialmente com glucanas e as variações em suas estruturas [193–195]. As glucanas com ligações glicosídicas β -1,3 são encontradas principalmente na forma miceliana [195] enquanto as glucanas com ligações α -1,3 é o principal constituinte entre polissacarídeos neutros na parede celular na fase de levedura [193]. Essa modificação parece ter um grande impacto na PCM, pois a inibição da transição da forma saprofítica de *Paracoccidioides* spp. para a patogênica pelo 17- β -estradiol, como descrito acima, provavelmente, tornam as mulheres adultas mais resistentes à PCM [190–192,196]. Essa mudança nas ligações glicosídicas também tem importância nas infecções com outros fungos dimórficos, tais como *B. dermatites* [197] e *Histoplasma capsulatum* [198]. No caso do *H. capsulatum*, o polímero α -1,3-glucana nas camadas mais externas na parede das leveduras oculta a β -glucana e impede seu reconhecimento pelo CLR dectina-1, um PRR presente na superfície de fagócitos. Sugere-se que esse processo de evasão de fungos dimórficos os diferencia em termos de potencial patogênico dos fungos filamentosos monomórficos [198].

5.3 Resposta imunológica na PCM

A PCM é uma doença resultante de constituintes relacionados ao fungo, como os fatores de virulência, bem como a forma pela qual o hospedeiro responderá a esse patógeno. Os modelos animais e as diferentes linhagens fúngicas têm sido utilizados a fim de se compreender o percurso da infecção, possibilitando-se observar a interação fungo-hospedeiro, da fase inicial à crônica [199]. Os macrófagos, principalmente os alveolares, são as células que primeiramente entram em contato com *Paracoccidioides* spp. e participam na defesa contra esses fungos [200–204]. De fato, os macrófagos apresentam um papel fundamental na PCM, o que pôde ser mostrado experimentalmente com o bloqueio funcional dessas células, o qual aumentou a gravidade da infecção por *Paracoccidioides*, independentemente da suscetibilidade ou resistência da linhagem de camundongo [205].

Apesar de sua importância inquestionável, é provável que os mecanismos microbicidas de macrófagos residentes não sejam suficientes para eliminar leveduras de *Paracoccidioides*, que se multiplicam dentro dessas células. Esse quadro muda de figura ao se ativar os macrófagos, que se tornam células fungicidas [201]. Em camundongos, mostrou-se que macrófagos peritoneais ativados inibem a transição de

micélio para levedura [206] e tem sua capacidade fungicida aumentada [207]. Esse é um mecanismo dependente de óxido nítrico (NO, do inglês, *nitric oxide*) [206], uma vez que camundongos deficientes da enzima induzível produtora de NO, a sintase 2 de NO (NOS2, do inglês, *NO synthase 2*), quando infectados com *P. brasiliensis*, apresentam granulomas malformados, permitindo a disseminação fúngica e progressão da doença [208]. Em humanos, o quadro em relação ao NO não é tão claro, pois a biópsias de lesões de mucosa oral e linfonodos de pacientes com PCM apresenta poucos macrófagos e células gigantes multinucleadas que expressam NOS2 nos granulomas [209]. Assim, torna-se difícil traduzir esses resultados de NO encontrado em modelos de PCM experimental para a PCM em seres humanos.

Algo bastante inusitado ocorre com macrófagos de camundongos das linhagens B10.A e A/Sn, suscetíveis e resistentes à infecção por *Paracoccidioides*, respectivamente. Os macrófagos de animais suscetíveis apresentam capacidade fungicida e ao serem ativados por IFN- γ e IL-12 produzem altos níveis de NO, IL-12 e a quimiocina MCP-1 e baixas quantidades de IL-10 e GM-CSF. Já os macrófagos da linhagem resistente apresentam-se pouco ativado com as citocinas descritas acima e com menor atividade fungicida, altos níveis secretados de IL-10 e GM-CSF e baixas concentrações de NO, IL-12 e MCP-1. Esses resultados aparentemente paradoxais têm sido explicados com base no ambiente pró-inflamatório induzido pela resposta inata. Quando ocorre no início da infecção, a forte inflamação pode produzir uma exacerbação da resposta dos linfócitos Th e, conseqüentemente, uma doença progressiva. Uma possibilidade é que o crescimento inicial de *P. brasiliensis* no local da infecção é menos prejudicial do que uma resposta inflamatória muito robusta e, assim, pode ocorrer uma apresentação mais adequada do antígeno aos linfócitos Th, tendo um desfecho mais favorável ao hospedeiro [210].

Sabe-se outros tipos de células de imunidade inata estão envolvidos nos mecanismos de defesas iniciais contra este patógeno fúngico, incluindo neutrófilos, células NK e DCs [211]. Os neutrófilos são as primeiras células que migram para o foco inflamatório e têm um papel relevante na patogênese da doença [212]. Em camundongos, essa importância dos neutrófilos na PCM pode variar de um modo dependente do *background* genético da linhagem [213,214], podendo persistir nas lesões até à fase crônica da infecção [215]. Além de constituir a primeira linha de defesa por fagocitar e eliminar *Paracoccidioides* através de mecanismos microbicidas, neutrófilos podem também auxiliar na geração de imunidade adaptativa eficiente, que

levaria à imunidade protetora [216]. Em relação à célula NK, existem poucos estudos sobre seu papel na PCM. É conhecido que há uma diminuição da resposta citotóxica dessas células em pacientes com PCM [217]. Já em modelo experimental murino, foi visto que as células NK apresentam atividade citotóxica contra células infectadas com *P. brasiliensis* e são capazes de inibir o crescimento fúngico *in vitro* [218]. Em um outro estudo foi confirmado que as células NK de pacientes com PCM exibem uma resposta citotóxica menor em comparação com indivíduos saudáveis, ocorrendo também um reconhecimento direto das leveduras de *P. brasiliensis*. Curiosamente, essa citotoxicidade é dependente de grânulos, mas não de perforina. Sugere-se que a granulísina seja o mediador do efeito citotóxico. Ademais, foi mostrado que as células NK estimuladas por *P. brasiliensis* são capazes de produzir IFN- γ e TNF, ou seja, sugere-se um papel imunoestimulador para células NK na infecção [219].

Em relação às DCs, o número de estudos tem se avolumado, o que reflete a importância dessas células para imunidade inata e adaptativa. Da mesma forma que acontece com outras células do sistema imunológico, DCs podem ter características diferentes em animais suscetíveis e resistentes a *Paracoccidioides* spp. Ferreira e colaboradores mostraram que DCs de camundongos resistentes são mais fagocitárias e produzem baixas concentrações de IL-10, IL-12 e TNF quando comparados a DCs de camundongos suscetíveis. Os autores sugerem que a suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides* pode resultar do envolvimento de células dendríticas reguladoras [220]. Aparentemente, camundongos suscetíveis a *Paracoccidioides* expandem células dendríticas mieloides pró-inflamatórias, sendo sugerido que não induzem uma proliferação adequada das células Th efectoras, enquanto os camundongos resistentes produzem células dendríticas mieloides e plasmocitoides, que estimulam de modo eficiente as células Th efectoras e aumento do desenvolvimento de Tregs. Nesse estudo, reforça-se a ideia de que as reações pró-inflamatórias inatas excessivas têm um efeito deletério, ou seja, a imunomodulação durante a paracoccidioidomicose pulmonar é benéfico para o hospedeiro [221]. De fato, existem indicações claras que as DCs têm um papel importante na indução ou supressão da imunidade adaptativa na PCM. Recentemente, Peron e colaboradores mostraram que DCs pulmonares que expressam o marcador CD103, uma integrina αE , levam à diferenciação de células Treg na infecção pulmonar por *P. brasiliensis* em camundongos, provavelmente, através da regulação negativa de moléculas coestimulatórias [222].

As interações de *Paracoccidioides* spp. com o hospedeiro são mediadas pelo reconhecimento de estruturas fúngicas conservadas, PAMPs, por PRRs presentes na superfície, nos endossomos e no citosol das células do sistema imunitário do hospedeiro. Em infecções fúngicas, o reconhecimento desses PAMPs permite a geração de um processo inflamatório que restringe o crescimento fúngico [223]. Na PCM experimental, foi mostrado que os PRRs dectina-1, receptor de manose, TLRs e NLRs estão envolvidos com as interações iniciais do hospedeiro com o fungo. Entre os TLRs, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 estão entre os que promovem a percepção dos componentes de *Paracoccidioides* [224–232] enquanto entre os indutores de inflamassomos estão o NLRP3 [233–235] e NLRC4 [236]. Embora sejam receptores de imunidade inata, esses sensores evidentemente influenciam as respostas adaptativas, determinando a origem dos antígenos reconhecidos pelos TCRs e BCRs e instruindo os linfócitos a induzir determinada resposta imunológica [237], através do aumento de receptores de segundo sinal (moléculas coestimuladoras) e de moléculas do MHC de classe II nas DCs, bem como indução de citocinas por essas células [73].

Paracoccidioides spp. adquire resistência aos mecanismos microbicidas impostos pelos elementos da imunidade inata ao se transformar em leveduras no hospedeiro. Caso não sejam inicialmente destruídos, esses fungos podem ser contidos ou eliminados pela imunidade adaptativa [237]. Após a infecção com fungos do gênero *Paracoccidioides*, as DCs pulmonares apresentam um aumento da expressão de CCR7 [238], um receptor que responde às quimiocinas CCL19 e CCL21, produzidas na zona paracortical dos linfonodos, uma área de células T [239]. Essas DCs também passam a expressar em sua superfície uma quantidade maior de moléculas do MHC de classe II, migram para o linfonodo drenante, onde ativam e diferenciam células Th, fenômeno importante para transição entre a imunidade inata e adaptativa [238]. A depender da frequência das células Th que se diferenciam em razão de sinais desencadeados por citocinas do microambiente dos linfonodos, decorre o desenvolvimento de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro ao fungo [240]. Assim, as DCs em sua interação com *Paracoccidioides* pode ser considerado um importante determinante do prognóstico da infecção.

Quando linfócitos Th recebem os dois primeiros sinais de ativação por receptores antígeno-específicos e receptores coestimuladores, e são estimulados com IL-12 e IFN- γ (terceiro sinal), diferenciam-se em células Th1, que produzem citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF. Essas citocinas levam à ativação clássica de

macrófagos (M1), induzindo um aumento da capacidade fungicida de dessas células, o que restringe o crescimento de *Paracoccidioides* spp. pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e baixa disponibilidade de nutrientes [206,241–244]. Esse processo de ativação dos macrófagos parece ser decisivo para a proteção, uma vez que o meio intracelular de fagócitos não primados com IFN- γ parece ser permissivo à sobrevivência e crescimento do *P. brasiliensis*, o que decorre dos mecanismos de evasão desse fungo, tais como aumento na expressão de enzimas antioxidantes, das proteínas de choque térmico e acumulação de fatores de virulência [200,201,245,246]. Já as células Th que receberam como terceiro sinal a IL-4, polarizam-se para células Th2, que se correlacionam com a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5 e IL-10, as quais desencadeiam o recrutamento de eosinófilos e desativam macrófagos, levando a uma infecção mais grave [241]. Em seres humanos, de um modo geral, o padrão de resposta Th1 está associado a infecções assintomáticas, ou seja, com proteção. A PCM desenvolvida de modo agudo, que é uma forma mais grave da doença, está mais correlacionada com o padrão de resposta Th2 [247].

Em relação aos linfócitos B, tem sido mostrado que a PCM é associada à hipergamaglobulinemia e ao aumento dos níveis séricos de imunocomplexos circulantes, o que reflete a ativação de células B nos pacientes [248]. Em camundongos, um estudo mostrou que células B-1, que secretam espontaneamente anticorpos naturais principalmente contra antígenos não proteicos na ausência de imunização exógena, podem ter influência na cinética de produção imunoglobulinas com isótipos e seu repertório que podem contribuir para indução de uma resposta Th2, afetando a resposta celular em camundongos suscetíveis durante a infecção com *P. brasiliensis* [249]. Não se sabe o papel das células B-1 em seres humanos, contudo, é conhecido que há um comprometimento dessa população com o avanço da idade, o que pode afetar a qualidade de vida e o aparecimento de doenças na população idosa [250]. Em um outro estudo experimental, Tristão e colaboradores mostraram que camundongos deficientes de células B infectados com *P. brasiliensis* tiveram maior taxa de mortalidade, aumento de carga fúngica pulmonar e altas concentrações de IL-10, quando comparados aos animais selvagens. Esses dados sugerem que as células B podem estar envolvidas no controle da organização das lesões granulomatosas observadas durante a PCM experimental [251].

A partir da resposta inata inicial a *Paracoccidioides* spp., desenvolve-se uma inflamação crônica, que quando ligada preferencialmente a um padrão de citocinas do

tipo Th1 [242], induz a formação de granulomas, cuja estrutura básica bem-organizada é composta por células epitelioides que cercam o foco infeccioso, assim como macrófagos, células gigantes multinucleadas e linfócitos – essa estrutura é responsável por impor limites à proliferação e disseminação das leveduras [173,201,252]. De fato, a inflamação granulomatosa durante a PCM em humanos [253] e experimental em camundongos [216] é dependente dos padrões de resposta imunológica adaptativa do hospedeiro, algo, que de certa forma, tem ligação com a imunidade inata. Pina e colaboradores mostraram que as respostas pró-inflamatórias inatas excessivas são deletérias no desenvolvimento da resposta adaptativa contra a PCM pulmonar, sendo a imunoproteção alcançada quando as DCs induzem respostas pró- e anti-inflamatórias bem equilibradas.

A ativação e desenvolvimento de DCs têm repercussões claras no desenvolvimento da PCM, devido a ao seu papel na diferenciação de células CD4⁺ e CD8⁺ em células produtoras de IFN- γ , IL-4 ou IL-17, bem como no aumento de células T-reguladoras [221]. A resultante dessas respostas iniciais consiste numa variação na inflamação crônica, pois se continuam exacerbadas são extremamente danosas ao tecido enquanto respostas muito brandas podem ser permissivas ao fungo. A regulação da resposta imunológica tem sido mostrada experimentalmente e pode passar por uma cinética de produção de citocinas das fases aguda à crônica. A resistência à infecção por *P. brasiliensis* parece ser dependente da secreção precoce de TNF e IFN- γ e a produção sustentada de IL-2 e IFN- γ , características de um padrão Th1, enquanto a secreção precoce e efêmera de baixos níveis de TNF e IFN- γ está associada à produção de IL-5, IL-10 e TGF- β , caracterizando a doença progressiva [241].

O desenvolvimento de resposta imunológica do padrão Th2 propicia uma PCM mais grave, todavia, parece ser importante para modular as respostas Th1, o que pôde ser visto em animais deficientes de IL-4 infectados com *P. brasiliensis*, os quais apresentam uma maior carga fúngica e granulomas malformados do que animais suficientes para o gene da IL-4 [254]. No entanto, quando esse fenômeno foi estudado em termos de linhagens susceptíveis (B10A) e resistentes (A/Sn) de camundongos, foi observado que o bloqueio de IL-4 com anticorpo monoclonal em camundongos suscetíveis levava a um aumento da infecção fúngica pulmonar enquanto nos animais resistentes havia uma melhora [255]. Provavelmente, outros fatores somam para essas respostas diferentes nesses animais com *backgrounds* e graus de resistência/suscetibilidade diferentes.

Com a descoberta de outros tipos de diferenciação de células Th [94], bem como das células Treg, foi possível avaliar alguns desses padrões de respostas. Em seres humanos, De Castro e colaboradores mostraram que indivíduos assintomáticos infectados com *Paracoccidioides* spp. apresentaram uma resposta predominante do padrão Th1, pacientes com a forma aguda tinham uma resposta mista desencadeada por células Th2 e Th9 e pacientes com a forma crônica foram caracterizados por uma resposta mista Th17/Th22 [247], bem como Th1 [256,257]. Desses novos tipos de células descritos, até o momento, células Th17 e Treg são as mais estudadas. As células Th17 secretam IL-17 e IL-22, sendo inflamatórias e responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e monócitos, que fagocitam e destroem fungos através de mecanismos microbicidas. Já as células Treg fazem uma supressão da resposta inflamatória (revisto por Calich *et al.*, 2019 [258]). É visto que as células Th17 podem causar autoimunidade e/ou inflamação enquanto as células Treg mantêm a homeostase por inibir essas respostas. Logo, esse eixo Th17/Treg de certa forma dita a quão inflamatória será a resposta adaptativa e qual será o nível de lesão tecidual [259]. Curiosamente, existe um aumento no número de células Treg em camundongos fêmeas infectados com *P. brasiliensis* por via intranasal ou intravenosa, juntamente com um aumento na infiltração de células T citotóxicas produtoras de IL-10 nos pulmões. Além disso, parece que a infecção por *P. brasiliensis* resulta em aumento da produção de IL-10 por APCs que expressam CD11c no tecido pulmonar e na indução de polarização Th17. Assim, o balanço na resposta imunológica a *P. brasiliensis* em camundongos fêmeas influencia o equilíbrio desse eixo Th17/Treg [260].

Embora a maioria dos estudos mostrem que a diferenciação de Th em Th17 é benéfico na PCM [234,261–264], seu papel na proteção a fungos ainda é controverso [259,265]. De fato, Th17 parece ser importante para imunidade contra *Paracoccidioides* spp., porém esse eixo Th17/Treg precisa ser melhor estudado. Se por um lado a eliminação de Treg de camundongos infectados com *P. brasiliensis* está associada ao aumento de produção de citocinas do padrão Th1 e Th17 e resgate hospedeiros de uma infecção progressiva e potencialmente fatal [266], por outro lado temos que pacientes assintomáticos têm resposta Th1 preponderante em suas lesões enquanto aqueles com a forma crônica, uma resposta mista Th17/Th22 [247]. Em animais infectados com *P. brasiliensis*, foi mostrado que ao se eliminar as células Treg, que controlam o efeito de células Th17, havia uma diminuição da carga fúngica pulmonar, hepática, e melhora no quadro inflamatório nesses órgãos quando

comparado aos animais controles [266], no entanto, essa situação pode promover uma resposta excessiva com danos ao tecido. Assim, parece claro que o ideal é uma resposta bem equilibrada mediada pelas células Th1, Th2 e Th17, evitando-se danos significativos ao tecido, o que parecer depender de um ajuste fino dessas respostas com células Treg [258].

É bastante interessante que o desenvolvimento desses padrões de resposta Th é ligado à ativação de PRRs. É certo que TLRs promovem uma resposta imunológica contra agentes infecciosos, porém, modelos experimentais de infecção com *P. brasiliensis* sugerem que esses fungos, ao penetrarem nos macrófagos do hospedeiro por meio dos receptores TLR2 e TLR4, usam esses PRRs como um mecanismo de escape [267]. Alguns estudos mostraram que TLR2 comporta-se como um regulador negativo em relação às células Th17. Camundongos deficientes de TLR2 tem um desvio de resposta para o padrão Th17, uma diminuição de células Treg e, conseqüentemente, um menor controle inflamação pulmonar desencadeada por *P. brasiliensis* [232]. Além disso, as DCs desses camundongos deficientes de TLR2 apresentam menor produção de IL-10. Nesses estudos, os autores sugerem que o aumento da expressão de TLR2 e de IL-10 em DCs se correlacionam com a suscetibilidade a PCM [220]. De modo semelhante a TLR2, a hiporesponsividade a TLR4 de camundongos C3H/HeJ tornam esses camundongos mais resistentes a infecção por *P. brasiliensis* [225,268]. Mas, diferente do o que ocorre com a estimulação de TLR2, ao se pesquisar o motivo pelo qual a sinalização de TLR4 levava a uma infecção mais grave, observou-se que a animais geneticamente suficientes para TLR4 infectados com *P. brasiliensis* apresentavam um aumento do influxo de macrófagos ativados e células T para os pulmões e controle progressivo de cargas fúngicas, porém, uma expansão prejudicada de células T reguladoras. Os autores sugerem que o controle do crescimento fúngico mediado por reações inflamatórias vigorosas é tão deletério para os hospedeiros quanto baixas cargas fúngicas ineficientemente controladas por reações inflamatórias limitadas [225].

O processo de evasão da resposta imunológica por *P. brasiliensis* também pode ocorrer pela ativação do TLR3, que reconhece RNA de cadeia dupla, funcionando como um regulador negativo das respostas contra PCM, diminuindo a resposta pró-inflamatória, a produção de NO, a ativação das células T citotóxicas produtoras de IFN- γ ou IL-17, bem como sua função citotóxica [226]. Já o TLR9, quando ativado, diminui a resposta inflamatória no início da infecção, o que melhora a resposta imunológica e

sobrevivência dos animais infectados [230], através do aumento da atividade fungicida de DCs estimuladas com agonistas desses receptores [231].

Atualmente, já é bem conhecido que a ativação celular via dectina-1 pode induzir proteção contra infecções fúngicas [269], contudo, várias das respostas a esses organismos, tais como a produção ideal de espécies reativas do oxigênio e de citocinas inflamatórias, precisam da colaboração com TLRs [270], incluindo TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 [271]. Em relação a *Paracoccidioides*, quando animais deficientes de dectina-1 foram infectados com esse fungo, suas respostas foram menos inflamatórias que a observada nos controles suficientes para o gene, visto que a deficiência resultou em macrófagos com perfil mais M2 (anti-inflamatórios), menor capacidade fungicida, baixa produção de NO e maiores concentrações de IL-10, diminuição de citocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17, aumento das células Treg e diminuição da migração de células T citotóxicas IL-17⁺ [262].

Ao que tudo indica, carboidratos e seus receptores no hospedeiro, tal como a dectina-1, desempenham um papel protetor na PCM pulmonar, através de uma ativação celular envolvida na morte desses fungos com produção de TNF, IL-12, IL-10, IL-17 [272], IL-32 [196], bem como IL-1 β , que é produzida em um mecanismo dependente de inflamação durante o desafio fúngico [196,235]. Na infecção por *Paracoccidioides* spp., o efeito de dectina-1 pode depender de outros PRRs, como mostrado por Loures e colaboradores, quando determinaram que dectina-1 colabora com TLR-4 na indução da proliferação de células T, ativação e desenvolvimento de células Th17. De forma similar, o receptor de manose coopera com esse TLRs na proliferação de linfócitos Th e T citotóxicos e na diferenciação dessas em células produtoras de IL-17 [261]. Certamente, a cooperação e interação entre diferentes PRRs podem ampliar a sinalização desencadeada pelos PAMPs por aumentar a avidéz e a cobertura da detecção dessas estruturas estranhas ao nosso organismo, possibilitando a potencialização das respostas imunológicas e abrindo caminho para novas intervenções imunoterapêuticas [273].

Uma enzima que tem sido mostrada como um mediador na regulação da resposta imunológica a *Paracoccidioides* é indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO-1). Essa enzima cataboliza o triptofano ao longo da via das cinureninas, desempenhando um papel importante na tolerância imunológica e evitando a imunopatologia devido a respostas imunológicas descontroladas ou exageradas [274]. Porém, um estudo mostrou que a eliminação local de triptofano tem um efeito inibidor na proliferação de

células T [275]. Sua função de supressão de resposta imunológica parece ter ligação com Tregs, uma vez que APCs que expressam IDO-1 induzem as células T *naïves* a se diferenciarem em Tregs e bloqueiam as respostas de células Th [274,276]. A partir dessas informações, não é de se estranhar que a função imunomoduladora mediada por essa enzima também tenha sido descrita na PCM [277–280]. Inclusive a atividade tolerogênica das pDCs, que aumenta a gravidade da PCM pulmonar, foi mostrada ser mediada por IDO-1 e células Treg [280]. A IDO-1 exerce seus efeitos imunossupressores por meio da regulação de função das células imunitárias inatas, tais como DCs, células supressoras derivadas de células mieloides (MDSC, do inglês, *myeloid-derived suppressor cells*) e células NK. Aparentemente, os efeitos imunossupressores locais e sistêmicos de IDO-1 dependem do recrutamento e ativação das MDSCs, as quais suprimem as respostas das células T [281]. Condizente com esses dados, recentemente, foi mostrado que o influxo de MDSC para o pulmão de camundongos infectados com *P. brasiliensis* levava a uma doença mais grave com diminuição de respostas imunológicas Th1 e Th17. Quando os animais foram destituídos de MDSC pelo tratamento com anticorpos contra Gr-1, um marcador dessas células, a imunidade protetora foi resgatada, o que resultou em uma doença menos grave [282]. Baseado na possibilidade de controle da imunossupressão desencadeada por IDO-1 e MDSCs, sugere-se que essa molécula e essa célula são potenciais alvos para imunoterapia contra câncer e PCM [281,282].

Os estudos atuais mostram que a resposta imunológica contra patógenos fúngicos depende da cooperação entre os diferentes componentes do sistema imunológico, os quais desenvolvem os diferentes programas de ativação. Embora, grandes avanços tenham sido obtidos nos últimos anos, ainda há necessidade de se conhecer todos os componentes envolvidos no processo de proteção ou suscetibilidade aos fungos e como esses se associam para a resultante do processo infeccioso.

5.4 Imunoterapia para PCM

O tratamento dos pacientes que desenvolvem a PCM é realizado por meio da implementação de terapia medicamentosa, que se iniciou com a publicação dos resultados bem-sucedidos de Ribeiro, em 1940, com o uso da sulfapiridina, um derivado da sulfanamida [283]. Inclusive, o tratamento com um derivado de sulfanamida, o sulfametaxol, em associação trimetoprim [284] continua em uso até os dias de hoje [285]. Uma outra droga bastante importante para o tratamento da PCM

foi introduzida por Lacaz e Sampaio, em 1958, a anfoterina B [286]. Na verdade, a anfotericina B foi a primeira droga antifúngica licenciada para uso em micoses sistêmicas, em 1959 [287]. A anfotericina B se tornou a base da terapia para infecções fúngicas graves, contudo, os efeitos colaterais em relação à infusão e à nefrotoxicidade fizeram com que se continuassem as buscas por antifúngicos menos tóxicos [288]. De fato, outras dessas drogas já vinham sendo pesquisadas. No caso dos compostos azólicos, apesar da primeira publicação ter ocorrido em 1944, por Woolley [289], foi apenas em 1958 que houve um interesse por esses medicamentos, o que ocorreu a partir do uso tópico de um outro derivado do imidazol, o clormidazol, seguido pelo uso de outros desses fármacos no final da 1960 – clotrimazol, o miconazol e o econazol [290]. O uso sistêmico de um azólico, o cetoconazol, veio a ser aprovado pelo FDA apenas em 1981. Devido a alguns problemas de toxicidade, uma segunda classe de azólicos foi desenvolvida, os triazólicos [288]. Dentre os compostos azólicos usados com maior sucesso no tratamento da PCM estão o itraconazol, o cetoconazol, o fluconazol e o voriconazol [285].

Apesar da eficácia dos medicamentos usados para tratar a PCM, esses estão longe de se enquadrar no conceito de “bala mágica”, proposto por Ehrlich [5,33]. Além dos efeitos colaterais, o tratamento com essas drogas tem um decurso extenso, podendo corresponder a meses ou anos, e recidivas. Durante o tratamento, o paciente deve ser submetido a cuidadosas avaliações clínicas, micológicas e laboratoriais para se ter um controle sobre a toxicidade dos antifúngicos. Tendo em vista esses problemas, alguns grupos de pesquisa, inclusive o nosso, têm investido esforços no sentido de buscar novas formas para resolução da PCM, dentre elas a imunoterapia.

5.4.1 Imunoterapia inespecífica

O primeiro relato sobre o uso de um imunoterápico em infecções experimentais com *P. brasiliensis* foi feito por Rezkallah-Iwasso e colaboradores, em 1984. Esses autores avaliaram o efeito do levamisol em hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) infectados previamente por via intratesticular com *P. brasiliensis*. O levamisol foi desenvolvido como um anti-helmíntico e mostrou-se, posteriormente, como um estimulador inespecífico do sistema imunológico (descrito no item 4.1.2). Apesar da via de infecção nesse estudo de Rezkallah-Iwasso e colaboradores não mimetizar a rota típica de infecção por *P. brasiliensis*, o efeito do levamisol foi interessante. A terapia foi avaliada em dois tempos diferentes: (1) terapia precoce – 3

semanas após a infecção, ou seja, animais ainda imunocompetentes, e (2) tratamento tardio – 12 semanas após a infecção, quando a resposta imunológica já estava comprometida. Em ambos os grupos a reação inflamatória foi caracterizada por granulomas epitelioides compactos quando comparado aos controles não tratados, contudo, a diminuição da carga fúngica ocorreu apenas nos animais submetidos à terapia precoce [291]. Embora promissor, o levamisol não foi mais estudado na PCM.

Um outro trabalho inicial de imunoterapia na PCM experimental foi realizado por Peraçoli e colaboradores [292]. Esses. Autores usaram uma técnica de produção de extratos de leucócitos dialisados (ELD), obtidos por lise de linfonodos e baços de hamsters sírios dourados imunizados com antígenos somáticos de *P. brasiliensis* (AgPb) ou de animais *naïves*, seguido de diálise desse lisado contra água destilada [293]. Normalmente, esse tipo de filtrado concentrado contém muitas moléculas e apresenta propriedades imunomoduladoras, que são atribuídas a pequenos peptídeos com massa molecular entre 3,5 e 6kDa (“fator de transferência” [FT]). O FT, como agente imunoterapêutico, tem como vantagem principal a indução de uma resposta imunitária rápida contra o patógeno, reduzindo o tempo para a resposta dos pacientes ao tratamento [294]. Os autores observaram que em relação aos controles infectados e não tratados, hamsters sírios dourados infectados e tratados com FT (ELD) na 3^a, 7^a, 11^a, 15^a e 19^a semana após a infecção tiveram uma resposta imunitária mediada por células durante todo o experimento e desenvolveram uma infecção menos extensa com um número significativamente menor de fungos nas lesões. Embora promova a melhora do quadro infeccioso, a ação do FT foi independente da fonte, ou seja, se os ELD foram obtidos de animais *naïves* ou imunizados com AgPb, sugerindo que a imunoestimulação foi inespecífica [292].

Muitos grupos propuseram, nas últimas duas décadas, imunoterapias para restaurar ou aumentar a imunidade antifúngica, no entanto, pouquíssimas dessas abordagens se converteram em estudos clínicos [295]. Na PCM há descrição de apenas um teste clínico, publicado em 1996, por Meira e colaboradores [296], onde glucana foi utilizada para estimular a resposta imunológica dos pacientes. Nesse estudo, os autores selecionaram 18 pacientes com PCM, todos sob tratamento com antifúngicos, os quais foram divididos em dois grupos. O grupo 1 (G1) tinha 10 pacientes, sendo dois com a forma aguda, sete com a forma crônica e infecção disseminada e um paciente com a forma crônica e uma infecção menos disseminada. O grupo 2 (G2) tinha oito pacientes com a forma crônica moderada. O G1 recebeu doses de 10mg de glucana, por

via intravenosa, uma vez por semana durante um mês, seguida de doses mensais, durante 11 meses, enquanto o G2 foi usado como controle sem tratamento com glucana. Os parâmetros usados para avaliar os pacientes mostraram que aqueles que receberam glucana apresentaram uma resposta mais favorável ao tratamento [296]. Não restam dúvidas que β 1,3-glucana é um potencial candidato a alvo imunoterapêutico, já que é um agonista de dectina-1, um PRR que parece desempenhar um papel protetor na PCM pulmonar [196,235,272]. Porém, pesquisas pré-clínicas com esse polissacarídeo são necessárias para se encontrar as melhores condições de tratamento. Além disso, a importância das glucanas para a biologia do fungo abre caminho para produção de inibidores de vias bioquímicas únicas de fungos, possibilitando a descoberta de novos fármacos para tratamento da PCM, assim como para outras infecções fúngicas [297].

O reconhecimento de β -1,3-glucana por dectina-1 é um exemplo de como interações proteína-carboidrato podem ser importantes em processos biológicos. De fato, o reconhecimento de carboidratos realizado por essas proteínas que são ubíquas na natureza, denominadas lectinas, compreendem a primeira etapa de vários processos que envolvem interações célula-célula, tais como infecção microbiana, fertilização, embriogênese, migração celular, formação de órgãos, defesa imunológica, dentre outros [298]. Embora Peumans e Van Damme [299] tenham feito uma redefinição de lectinas tendo como base as moléculas de plantas, é certo que essa possa ser estendida a lectinas de todos os seres vivos, isto é, “proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga de modo específico e reversível a um mono ou oligossacarídeo (CRD, do inglês *carbohydrate recognition domain*)”. Vale a ressalva sobre anticorpo que reconhece carboidrato, esse não é caracterizado como lectina.

Na década de 1990, nosso grupo vinha estudando uma lectina ligante de manose extraída das sementes de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), inicialmente chamada de KM⁺ e renomeada, posteriormente, como ArtinM – Art de *Artocarpus*, in de *integrifolia* e M⁺ por ser ligante de manose [300]. *A. integrifolia* é uma sinônimoia para o nome aceito da planta *A. heterophyllus*. Mostrou-se que ArtinM era uma ferramenta para várias aplicações biomédicas, tais como a ativação de células da imunidade inata – neutrófilos [301–303], mastócitos [304], macrófagos [305,306] e células dendríticas [307].

Em um desses estudos com ArtinM, foi mostrado algo surpreendente [306], essa lectina tinha a capacidade de estimular, de um modo dose-dependente, células esplênicas de camundongos BALB/c a produzirem IFN- γ (Figura 1A). Quando sobrenadantes de cultura de células da linhagem macrofágica J774 estimuladas com ArtinM, por 48 horas, foram destituídos da lectina e usados para estimular células esplênicas, observou-se que alguma molécula presente nesse meio condicionado era responsável por induzir a produção de IFN- γ (Figura 1B). Havia um palpite de que essa molécula seria IL-12, o que foi comprovado quando essa citocina foi bloqueada com concentrações variáveis de anticorpos anti-IL-12, ocorrendo uma redução dose-dependente da produção de IFN- γ (Fig. 1C). Como esperado, além de células J774, macrófagos peritoneais e esplênicos de BALB/c ou C3H e duas outras linhas macrofágicas produziam IL-12 em resposta ao estímulo com ArtinM. Quando a lectina foi injetada em camundongos BALB/c, observou-se que ela revertia o padrão de resposta contra antígeno de *Leishmania major* de Th2 para Th1. Foi incrível observar que a infecção com *L. major* desses animais suscetíveis tratados com ArtinM tinha uma resultante similar a dos animais resistentes, retornando ao *status* de suscetíveis ao serem tratados com anticorpos contra IL-12 (resultados mostrados em [306], apêndice 2, artigo 1).

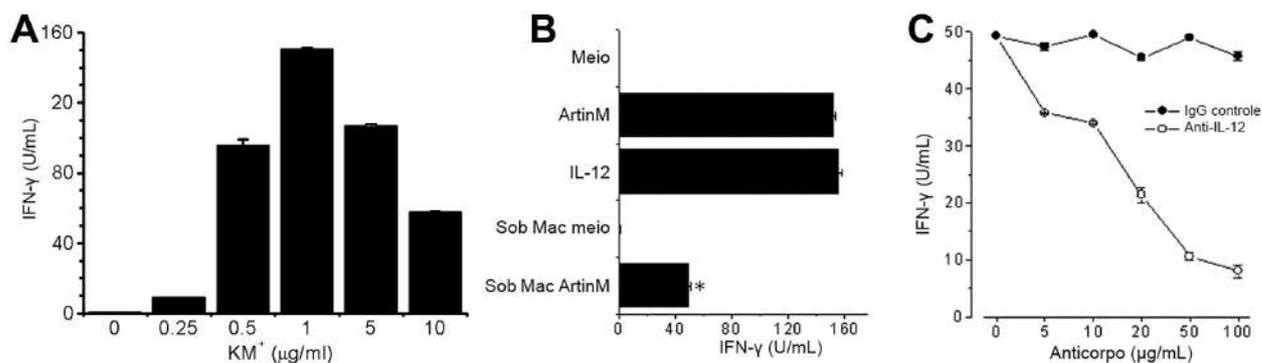


Figura 1. ArtinM estimula macrófagos a produzir IL-12, na qual induz a produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongo. (A) Células de baço ($2 \times 10^6/\text{mL}$) de camundongos BALB/c foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de ArtinM, por 48 horas. Os resultados são as médias da concentração de IFN- $\gamma \pm$ DP, de experimentos feitos em triplicada. (B) As células de linhagem macrofágica J774 foram cultivadas na presença de ArtinM ($3\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 48 horas, o sobrenadante foi depletado de lectina por adsorção a D-manose-agarose e utilizado, diluído dez vezes, para estimular células esplênicas de BALB/c ($2 \times 10^6/\text{mL}$) (Sob Mac ArtinM). Controle negativo: sobrenadante de células J774 não estimulada (Sob Mac Meio). Controles positivos: ArtinM ($1\text{mg}/\text{mL}$) ou IL-12 recombinante ($2\text{ng}/\text{mL}$). * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle negativo (sobrenadante de células J774 não estimuladas). (C) Os sobrenadantes das culturas de células J774 estimuladas com ArtinM foram pré-incubados na presença de diferentes concentrações de mAb anti-IL-12 (círculos abertos) ou mAb de rato irrelevante, (círculos fechados), por 1 h antes de serem adicionados às culturas. Os resultados são as médias da concentração de IFN- $\gamma \pm$ DP de triplicatas de poços. Os resultados são representativos de três experimentos.

Esses experimentos sobre indução de IL-12 e citocina do perfil de resposta Th1 (IFN- γ) por ArtinM possibilitaram pressupor que essa lectina poderia ser protetora no modelo experimental de PCM [305]. Quando camundongos BALB/c infectados i.v. com *P. brasiliensis*, linhagem Pb18, foram submetidos a tratamentos que variaram de acordo com o número e intervalos de injeção, observou-se que em todos os regimes de administração de ArtinM havia uma redução significativa da carga fúngica, sendo a melhor condição associada à administração de uma única injeção subcutânea (s.c.) de ArtinM no dia 10 pós-infecção (resultados mostrados em Coltri *et al.*, 2008 [305], Apêndice 2, artigo 2). A quantidade de leveduras no pulmão de camundongos infectados e tratados com o veículo – solução salina isotônica tamponada com 10mM de fosfato, pH 7,4 (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*), 30 dias após a infecção, era de cerca de 3 e 10 vezes maior do que a de animais infectados e tratados com ArtinM da planta (jfArtinM) ou a recombinante (rArtinM), respectivamente (Figura 2A). No homogeneizado de pulmão desses animais infectados e tratados com ArtinM foi visto que as concentrações de IFN- γ , IL-12p70 e TNF- α eram significativamente maiores do que aqueles de camundongos sem terapia, IL-4, significativamente menores, enquanto as concentrações de IL-10 foram similares (Figura 2, B-E). Em relação à produção de NO, indiretamente visto pela presença de nitrito, notou-se que os níveis eram maiores nos animais tratados com jfArtinM ou rArtinM do que nos camundongos não tratados (Figura 2F). A análise histológica do pulmão dos animais infectados e tratados com ArtinM mostrou que havia pouquíssima área inflamada e arquitetura broncoalveolar bem preservada com ausência de leveduras, o que foi contrastante com os achados histopatológicos dos animais infectados e injetados com PBS, onde encontravam-se múltiplos granulomas epitelioides típicos e grande número de leveduras (resultados mostrados em Coltri *et al.*, 2008 [305], Apêndice 2, artigo 2).

Para confirmar os resultados anteriores, onde mostrou-se a importância de IL-12 produzida em resposta à ArtinM, e verificar se a melhora no quadro dos animais infectados e injetados com essa lectina era dependente de NO, camundongos deficientes de IL-12 (IL-12^{-/-}) e óxido nítrico sintase induzida (NOS2^{-/-}) foram infectados e tratados com ArtinM. A carga fúngica nos animais IL-12^{-/-} infectados e tratados foi alta e semelhante àquela dos animais controles injetados com o veículo (Figura 3A), comprovando a importância dessa citocina para o efeito benéfico trazido pelo tratamento com ArtinM em animais infectados com *P. brasiliensis*. Em relação ao NO, fora visto anteriormente que animais selvagens infectados e tratados com ArtinM

tinham uma produção maior dessa molécula que os controles, o que tornou os resultados com animais NOS2^{-/-} inesperados. Quando animais deficientes e suficientes para o gene do NOS2 foram infectados e tratados com ArtinM, os dois grupos de animais resolveram a infecção de modo similar (Figura 3B), indicando que a indução de óxido nítrico não é crítica para proteção conferida por ArtinM [305].

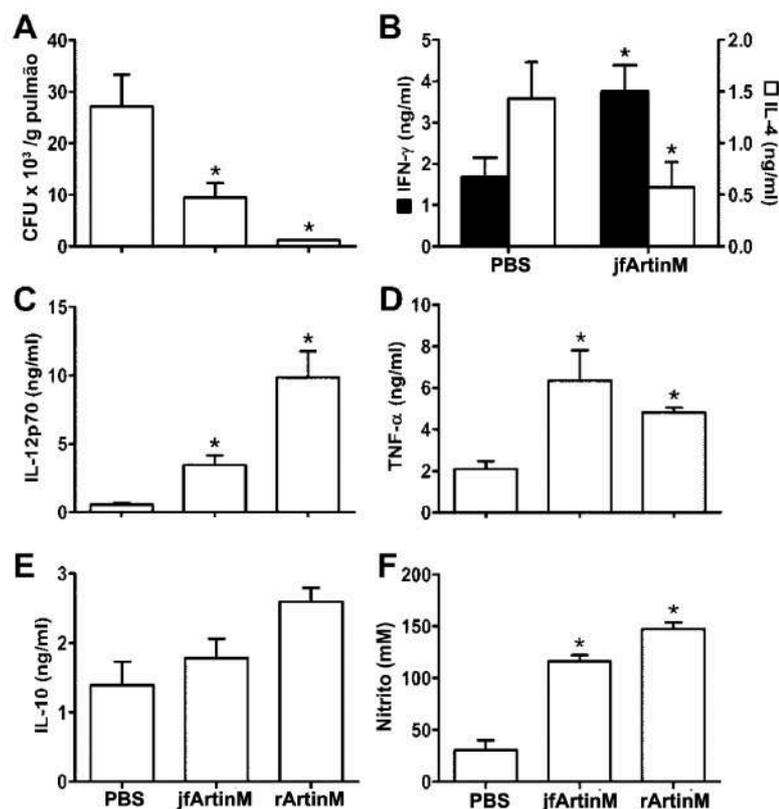


Figura 2. Efeito terapêutico do ArtinM na infecção por *P. brasiliensis*. Camundongos injetados i.v. com 10⁶ leveduras foram tratados com jfArtinM, rArtinM ou PBS (controle). Os homogeneizados pulmonares obtidos desses camundongos foram analisados 30 dias após a infecção. (A) Unidades formadoras de colônias (CFU)/grama de pulmão, (B-E) níveis de citocinas e (F) concentrações de nitrito. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. *, P < 0,05 versus grupo controle.

Os resultados nesse estudo possibilitaram imaginar que que ArtinM se ligava a algum PRR para induzir a produção de IL-12. Quando os macrófagos de camundongos deficientes MyD88, molécula adaptadora importante para sinalização de muitos PRRs, foram estimulados *in vitro* com ArtinM, não houve a detecção de IL-12 no sobrenadante (dados não mostrados), sugerindo que a produção de IL-12 induzida por ArtinM poderia ser dependente da via de sinalização TLRs/MyD88. A fim de investigar o possível papel de TLR2 ou TLR4 na produção de IL-12 induzida por ArtinM, comparou-se as concentrações de IL-12 liberadas por macrófagos estimulados por ArtinM de camundongos TLR2^{-/-} versus TLR2^{+/+}, ou de camundongos deficientes em TLR4 versus camundongos WT. Conforme mostrado na figura 3C, diferente dos

macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 e camundongos controle, os macrófagos de camundongos TLR2^{-/-} não produziram IL-12 em resposta a ArtinM ou em resposta a zimosan. Além disso, a produção de IL-12 por macrófagos estimulados por ArtinM foi inibida por D-manose a 50mM, o monossacarídeo específico de ArtinM. Esses resultados indicam não apenas que TLR2 desempenha um papel crítico na produção de IL-12 mediada por ArtinM, mas também que a estimulação celular ocorre de maneira dependente do reconhecimento de carboidratos [305].

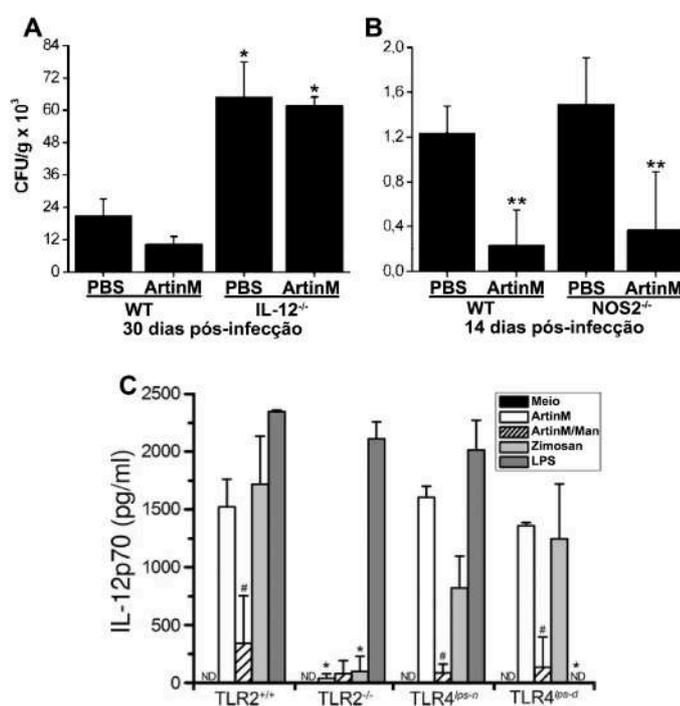


Figura 3. ArtinM não protege camundongos IL-12^{-/-} da infecção por *P. brasiliensis*, mas protege uniformemente camundongos NOS2^{-/-} e WT, em um mecanismo de produção de IL-12 dependente de TLR2. Camundongos (A) IL-12^{-/-} e (B) NOS2^{-/-}, bem como seu equivalente WT, foram infectados i.v. com 10⁶ células de levedura *P. brasiliensis* e tratados ou não com jfArtinM, 10 dias após a infecção. O número de leveduras viáveis foi determinado por CFU/grama de tecido, no dia 14 após a infecção para os camundongos NOS2^{-/-} e no dia 30 para os animais IL-12^{-/-}. Os resultados representam a média ± SD de três camundongos por grupo e são representativos de pelo menos dois experimentos. *, P < 0,05 versus grupo controle (WT). **, P < 0,05 versus controle (PBS). (C) Macrófagos peritoneais de camundongos TLR2^{+/+} (C57BL/6); TLR2^{-/-}; C3H/HePas (TLR4^{lps-n}, expressando um TLR4 funcional) e C3H/HeJ (TLR4^{lps-d}, expressando um TLR4 não funcional) foram cultivados por 48 horas na presença ou ausência de jfArtinM (5µg/mL), zimosan (10µg/mL) ou LPS (10µg/mL). Em alguns experimentos, os macrófagos foram cultivados com jfArtinM na presença de 50mM D-manose (ArtinM/D-Man). A quantidade de IL-12p70 no sobrenadante foi determinada por ELISA de captura. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. *, P < 0,05 versus grupo controle. #, P < 0,05 versus controle positivo (ArtinM). ND, não detectado.

Além dos resultados impressionantes de ArtinM como molécula imunoterapêutica, essa também se mostrou eficiente em estimular resposta profilática em infecções experimentais com *P. brasiliensis* [308].

De fato, existe uma possibilidade de uso, principalmente, terapêutico de ArtinM em pacientes com PCM. Porém, outras pesquisas precisam ser realizadas para diminuir a imunogenicidade da molécula, pois quando for necessário mais de uma administração da molécula, poderia haver a produção de anticorpos que bloqueariam a atividade de ArtinM. O mais importante é perceber que esse trabalho abriu caminho para pesquisas de novas abordagens imunoterapêuticas para infecção com *Paracoccidioides*. Isso porque existe uma série de atividades de ArtinM, tais como ativação clássica de macrófagos (polarização M1) dependente do TLR2 e CD14 [309], indução da produção de IL-12 e IL-23, levando a diferenciação de células Th em Th1 e/ou Th17 [305,306,310,311] e interação direta dessa lectina com os carboidratos do receptor CD3 em linfócitos, o que é seguido pela diferenciação de células T CD4⁺ em células Th17 [311], que possibilitaram presumir que outras moléculas agonistas de PRRs pudessem ter efeito similar.

Quando um membro de nosso grupo pesquisava um determinado antígeno candidato a imunoterápico para PCM, para garantir que uma forte resposta antiproteína fosse desenvolvida, utilizou o antígeno emulsificado em adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês, *complete Freund adjuvante*). Foi surpreendente observar que apenas o controle, PBS emulsificado em CFA, tinha um efeito benéfico na infecção experimental com *P. brasiliensis*, sendo investigado a ação desse adjuvante no tratamento dos animais infectados [312]. Pelo fato de CFA induzir uma resposta mais Th1 enquanto o adjuvante incompleto de Freund (IFA, do inglês, *incomplete Freund adjuvant*) promoveu um *status* mais Th2 [313], camundongos BALB/c foram infectados i.v. com *P. brasiliensis* e tratados s.c. com CFA ou IFA, 21 dias após a infecção. Como mostrado na figura 4, 30 dias após a terapia, os camundongos injetados com CFA apresentavam 2,4 logs de redução na uma carga fúngica quando comparados aos camundongos tratados com IFA, correspondendo a 99% menos UFC por grama de tecido pulmonar (Figura 4A). Ao se analisar a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias nos sobrenadantes de homogeneizados pulmonares de camundongos infectados com *P. brasiliensis* tratados, observou-se que o grupo injetado com CFA produziu altos níveis de IFN- γ , IL-4, IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β quando comparado ao grupo tratado com IFA (Figura 4B–G), sugerindo uma supressão da resposta

imunológica nos animais tratados com IFA. Os dados de CFU estavam de acordo com as análises histopatológicas, as quais mostraram que a imunoestimulação terapêutica com CFA levou a uma marcada diminuição da carga fúngica (resultados mostrados em [312], Apêndice 2, artigo 3). Camundongos controles tratados com IFA apresentaram múltiplos locais de granulomas epitelioides focais e confluentes (Figura 4H) com halos linfomonocíticos circunscrevendo um alto número de células leveduriformes viáveis e não viáveis. A análise morfométrica dos pulmões de camundongos tratados com IFA revelou $41 \pm 5,2$ granulomas, com uma área relativa de comprometimento pulmonar de $40,7 \pm 6,2\%$ (dados mostrados por Oliveira *et al.*, 2008 [312]). Em contraste, não foram observados granulomas ou leveduras nas seções pulmonares examinadas dos camundongos infectados e tratados com CFA e uma arquitetura alveolar bem preservada (Figura 4H) [312].

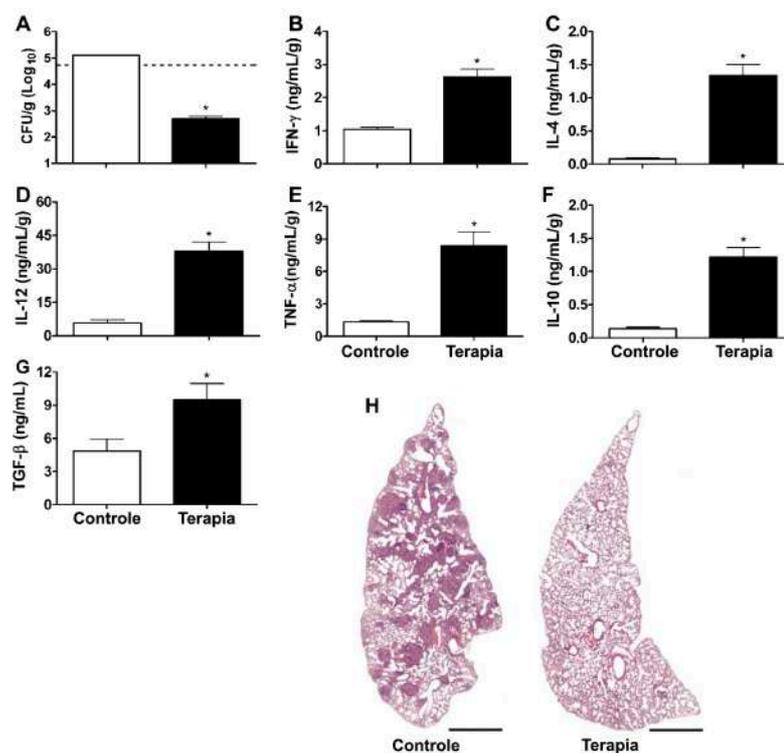


Figura 4. Efeito terapêutico do adjuvante CFA na infecção por *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c infectados i.v. com 10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis* foram tratados s.c. no dia 20 pós-infecção com IFA (controle) ou CFA (terapia). Após 30 dias do tratamento, analisou-se (A) a quantidade de CFU por grama de pulmão. A linha horizontal tracejada indica o número de CFU/g de tecido dos animais no dia do tratamento (21 dias de infecção). As barras representam as médias \pm DP das CFU/g de tecido. *P < 0,05 em relação às CFU dos demais grupos e o CFU no início do tratamento. (B-G) Fragmentos de pulmões foram homogeneizados em PBS, centrifugados e os sobrenadantes colhidos para dosagem das citocinas por ELISA. As barras representam as médias \pm DP das concentrações de citocinas em duplicata. *P < 0,05 em relação ao animal controle. (H) Fragmentos do pulmão foram colhidos e processados para análise histológica. Através do uso do programa ImageJ Pro, as imagens foram capturadas, copiadas e transformadas em leitura digital, sendo analisadas quanto ao número de granuloma, área média dos granulomas, lesão pulmonar e presença de infiltrado e fungos no granuloma.

O CFA é um adjuvante cujo uso não é permitido em seres humanos, havendo restrições para uso em animais de experimentação, fato que motivou nosso grupo a investigar se outro adjuvante poderia ser um imunoterápico para PCM. Pelo fato de a eficácia do CFA em direcionar a resposta imunológica para um perfil Th1 ser devida, em grande medida, pela presença de componentes de *M. tuberculosis*, que levam ao desenvolvimento de hipersensibilidade retardada [314,315], aventou-se a hipótese de que a vacina BCG (*M. bovis* atenuado) pudesse ser esse imunoterápico. Infelizmente, ao se avaliar BCG como tratamento para infecção com *P. brasiliensis* em camundongos, não foi observado efeito benéfico [316]. A partir desse resultado, buscou-se encontrar outros potenciais adjuvantes imunoterápicos para uso em humanos que tivesse efeito similar ao do CFA, sendo esses: MPLA (um agonista de TLR4), PAM₃CSK₄ (um agonista de TLR2), alúmen (hidróxido de alumínio – Al(OH)₃) e ASO₄ (associação dos adjuvantes alúmen e MPLA) (Apêndice 2, artigo 5). Dos adjuvantes usados para tratamento s.c. no dia 20 após a infecção i.v. de camundongos com *P. brasiliensis* (Pb18), apenas MPLA reduziu a carga fúngica de forma similar ao CFA quando comparado ao grupo de animais infectados e não tratados (controle) (Figura 5). Foi interessante notar que alúmen, além de não melhorar o quadro, ainda reverteu o efeito benéfico de MPLA quando esses adjuvantes foram injetados em conjunto no adjuvante ASO₄ [317,318].

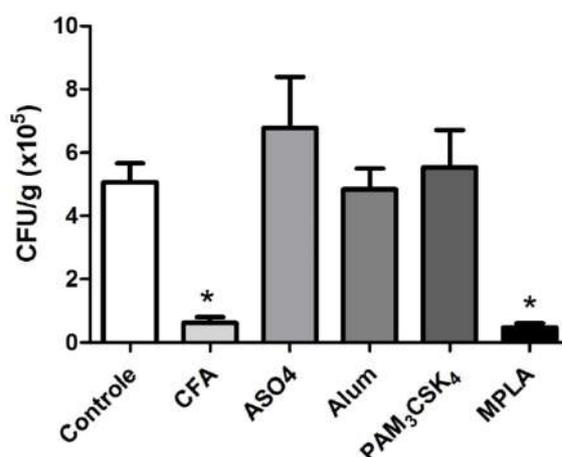


Figura 5. O adjuvante liberado para uso em seres humanos MPLA, mas não Alúmen, ASO₄, e PAM₃CSK₄, tem efeito protetor similar ao observado para CFA na infecção por *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c infectados i.v. com 10⁶ leveduras da linhagem 18 de *P. brasiliensis* foram tratados s.c. no dia 20 pós-infecção com (A) CFA, ASO₄, alúmen (Alum), PAM₃CSK₄ ou MPLA. Como controle foram usados animais infectados e não tratados. Após 30 dias do tratamento, analisou-se a quantidade de CFU por grama de pulmão. As barras representam as médias ± DP das CFU/g de tecido. *P < 0,05 em relação à CFU do grupo controle.

Experimentos adicionais mostraram que o efeito de MPLA era consistente e apresentava uma melhora no quadro inflamatório, o que fora compatível com os resultados obtidos com CFA (Figura 6). A proteção mostrada por MPLA é refletida pela redução significativa da carga fúngica nos pulmões, ou seja, $0,36 \times 10^5$ CFU/g \pm 0,10 em camundongos tratados com MPLA e $5,47 \times 10^5$ CFU/g \pm 0,15 nos controles (Figura 6A). A análise histopatológica mostrou que os pulmões de camundongos não tratados exibiram granulomas confluentes e extenso dano tecidual (Figura 6B). Já os camundongos tratados com CFA (Figura 6C) ou MPLA (Figura 6D) tiveram uma redução da área da lesão e do infiltrado inflamatório, formando granulomas compactos e delimitados, o que estava de acordo com os resultados de carga fúngica [317,318].

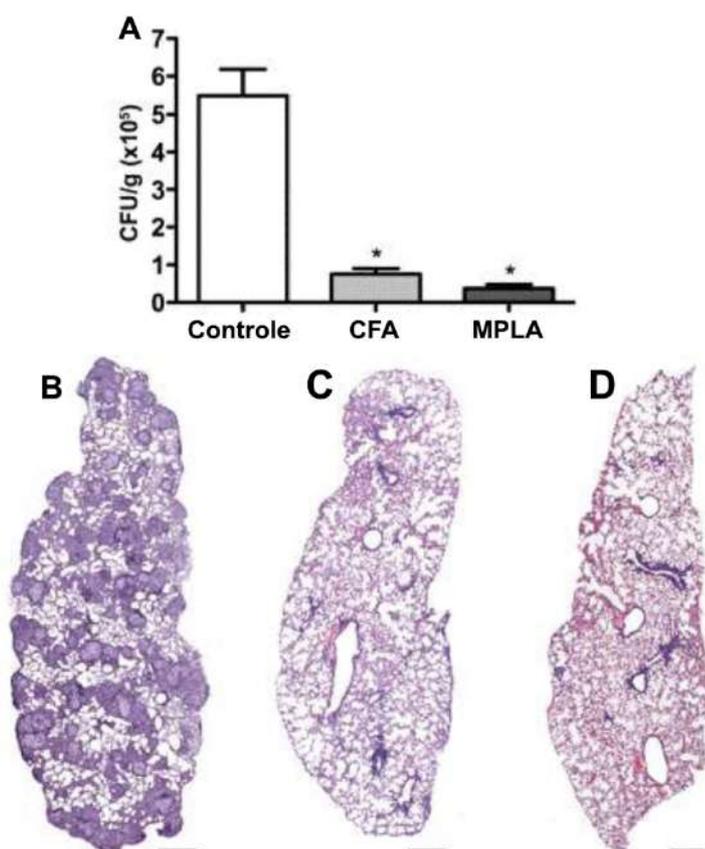


Figura 6. O tratamento com MPLA induz redução significativa da carga fúngica e manutenção da arquitetura pulmonar em camundongos infectados por *P. brasiliensis*. (A) Camundongos infectados i.v. com 10^6 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) foram tratados s.c. com CFA e MPLA, no dia 20 pós infecção, ou mantidos sem tratamento (controle). Os animais foram mortos 30 dias após o tratamento e fragmentos do pulmão foram removidos e processados para (A) análise da quantidade de CFU por grama de pulmão e (B-D) análise histopatológica. As barras em A representam as médias \pm DP das CFU/g de tecido. * $P < 0,05$ em relação à CFU/g de tecido do grupo controle. A prancha B corresponde a um corte de pulmão de animal infectados e não tratado, a C e D, de animais infectados e tratados com CFA e MPLA, respectivamente. As seções pulmonares foram coradas com H&E. Barras de escala = 1 mm.

Como mostrado na figura 7, camundongos infectados tratados com CFA e MPLA apresentaram concentrações significativamente maiores das citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF e menores das anti-inflamatórias de IL-4 e IL-10 em relação aos controles. O IFN- γ aumenta a eliminação de células fúngicas e a expressão de mediadores inflamatórios por macrófagos e em sinergia com o TNF tem se mostrado crítico para a resistência na PCM [242]. Em contraste, a IL-10 é considerada um mediador que facilita a infecção, embora também seja capaz de prevenir os efeitos imunopatogênicos da resposta imunológica Th1 [220]. Curiosamente, os grupos que receberam CFA ou MPLA apresentaram níveis de IL-17 semelhantes aos do grupo controle. Pagliari e colaboradores [264] mostraram a presença de células que expressam IL-17 em lesões cutâneas e mucosas na PCM, sendo sugerido que essas células estão associadas à organização dos granulomas. Na PCM experimental, a resposta da IL-17 parece ser benéfica [234,261–264], contudo, ainda é controverso seu real papel na proteção a infecções fúngicas [259,265].

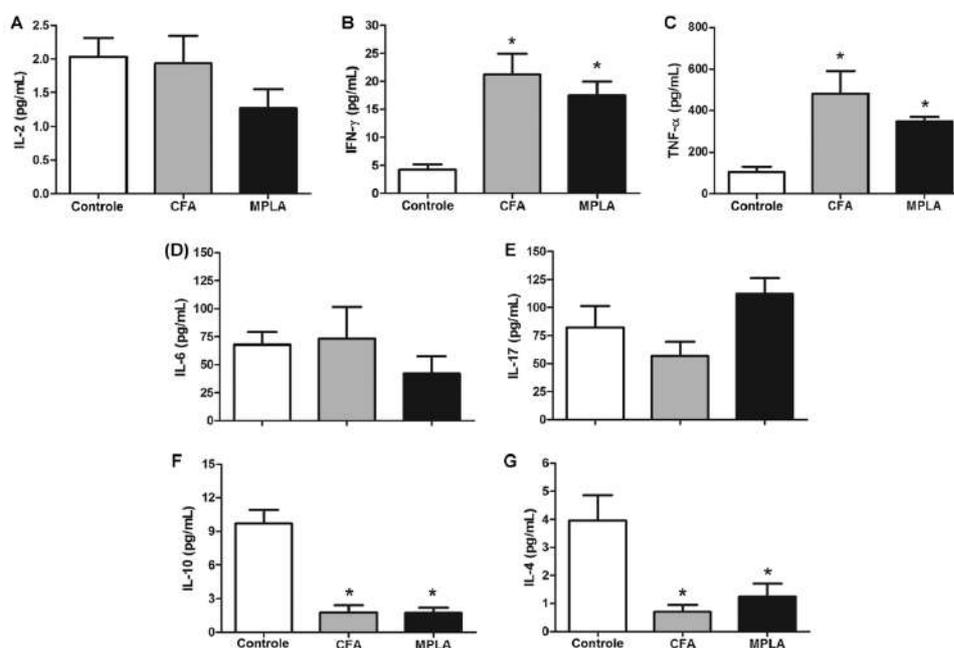


Figura 7. Perfil de citocinas de camundongos infectados e tratados com MPLA ou CFA. Camundongos BALB/c foram infectados e tratados como descrito na legenda da figura 6. Após 30 dias do tratamento, fragmentos de pulmões foram homogeneizados em PBS, centrifugados e os sobrenadantes colhidos para dosagem de IL-2 (A), IFN- γ (B), TNF (C), IL-6 (D), IL-17 (E), IL-10 (F) e IL-4 (G), por ELISA. As barras representam as médias \pm DP das concentrações de citocinas em duplicata. *P < 0,05 em relação ao animal controle.

Esses resultados obtidos com MPLA são muito empolgantes porque mostram o efeito extraordinário de um adjuvante já em uso em vacinas para seres humanos na

eliminação de fungos em animais infectados, mostrando um grande potencial para ensaios clínicos em pacientes com PCM.

5.4.2 Imunoterapia para PCM com antígeno(s) específico(s) de *Paracoccidioides*

A quantidade de moléculas estimuladoras inespecíficas do sistema imunológico com potencial imunoterapêutico para combater doenças infecciosas é bastante grande, o que inclui as moléculas que reconhecem carboidratos. As lectinas estão presentes em todos os seres vivos e porque não estariam em fungos do gênero *Paracoccidioides*. Ao serem isoladas, teriam potencial para estimular o sistema imunológico por ligação a PRR, como visto para ArtinM, e ao mesmo tempo induzir respostas imunológicas adaptativas, uma vez que seriam antígenos desses fungos. Optou-se por descrever essas moléculas nesse subitem, na condição de antígeno.

Uma lectina que atende a esses requisitos é conhecida como paracoccina, a qual se liga a N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc). A paracoccina foi descoberta e tem sido estudada desde então pelo grupo da Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Roque-Barreira, sendo isolada, inicialmente, de sobrenadantes de cultura de leveduras de *P. brasiliensis* por cromatografia de afinidade em coluna de GlcNAc imobilizada. Essa molécula de aproximadamente 70kDa foi descrita como uma proteína de superfície de leveduras de *P. brasiliensis* e que apresenta capacidade de estimular macrófagos de camundongos a produzir *in vitro* altas e persistentes concentrações de TNF e NO [319], os quais são associados à proteção contra *P. brasiliensis* [242,320]. Posteriormente, mostrou-se que a paracoccina interagia com quitina, um polissacarídeo com repetições de β -1,4-GlcNAc, e quando incubada com leveduras de *P. brasiliensis*, marcava sítios de brotamento do fungo [321]. Ademais, foi sugerido que a paracoccina é importante no processo de crescimento e remodelamento da parede das leveduras de *P. brasiliensis* [321–323], fenômeno associado a uma propriedade enzimática dessa proteína, a atividade N-acetil-D-glicosaminidase [322,323]. Baseados em dados de proteômica, uma sequência gênica putativa da paracoccina foi clonada, sendo possível a produção da proteína recombinante [324]. Essa recombinante tinha as características bioquímicas da paracoccina nativa, com exceção da massa molecular, ou seja, a nativa tinha ~70kDa enquanto a recombinante, ~28kDa. Essa diferença de massa molecular poderia ser explicada por uma clonagem parcial do gene da paracoccina, ou seja, apenas do domínio enzimático da proteína. Quando a paracoccina recombinante foi

usada como imunoterápico, verificou-se que os camundongos tratados apresentavam um padrão de resposta Th1, provavelmente, dependente de TLR2, e diminuição de carga fúngica [324,325]. Curiosamente, a infecção realizada com leveduras destituídas de paracoccina por silenciamento gênico, desencadeou uma infecção mais branda e mortalidade reduzida quando comparado aos animais infectados com leveduras selvagens [326]. Ao contrário, as leveduras que superexpressavam paracoccina desencadearam uma infecção sistêmica grave, alta carga fúngica e elevadas taxas de mortalidade [327]. Em conjunto esses resultados mostraram que a paracoccina tem características de um bom imunoterápico para PCM, comportando-se um fator de virulência por sua expressão ser associada à patogenicidade do fungo [328].

A adesão dos patógenos ao tecido hospedeiro é um pré-requisito para a invasão e colonização tecidual e infecção. Em fungos como em outros patógenos, essa característica pode ser devida a estruturas compostas por adesina(s) que se liga(m) a glicanas teciduais. Dentre as adesinas de fungos do gênero *Paracoccidioides*, destaca-se a glicoproteína de 43kDa (gp43), a qual está presente em espécies do complexo *P. brasiliensis* [178,182,329] e é indubitavelmente a proteína mais estudada desses fungos [330,331]. A gp43 tem sido associada à patogenicidade de *P. brasiliensis*, com ênfase para a sua ligação à laminina da matriz extracelular [330,332], levando à adesão de *P. brasiliensis* à superfície de células epiteliais [333], o que permitiria a invasão e a disseminação tecidual do fungo.

Além de participação no processo de colonização do tecido do hospedeiro, foi mostrado que a gp43 tem um papel na adesão de *P. brasiliensis* aos macrófagos, fenômeno que leva à fagocitose desse fungo [334]. À primeira vista, esses resultados podem sugerir que a gp43 favorece a eliminação de *P. brasiliensis*, no entanto, observou-se o contrário, desde que a essa glicoproteína bloqueia a capacidade fungicida de macrófagos via receptores de manose, inibindo a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e NO, podendo consistir em um dos mecanismos que esse fungo usa para evasão ao sistema imunológico [335]. Em termos de imunidade adaptativa, a gp43 parece estimular a liberação preferencial de citocinas do padrão Th1 em camundongos resistentes enquanto em animais susceptíveis induz a uma ativação de uma resposta Th2 [336]. Ferreira e colaboradores, em 2004, mostraram que a gp43 purificada de *P. brasiliensis* tinha um efeito inibitório na liberação de IL-12 e levava à regulação negativa da expressão de moléculas do MHC de classe II em DCs e menor adesão de DCs imaturas. Ademais, a gp43 modificava a maturação de DCs induzidas por LPS,

levando à diminuição na expressão de moléculas do MHC de classe II, CD80, CD54 e CD40 [337], as quais são importantes para ativação de células Th [73]. Inclusive, mostrou-se que DCs pulsadas com gp43 induziu um significativo aumento da carga fúngica em animais suscetíveis infectados com *P. brasiliensis* quando comparados ao grupo controle não imunizado [338]. Dessa forma, gp43 parece reduzir a eficácia da resposta imunológica, promovendo o estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*.

Em pacientes com PCM, observa-se uma forte reatividade imunológica humoral para gp43 e uma resposta inadequada de células T [339]. Quando as células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) de pacientes com formas aguda e crônica foram estimuladas com gp43, houve a produção de baixas concentrações de IL-2 e IFN- γ e maiores concentrações IL-10 enquanto PBMC de indivíduos saudáveis produziam quantidades substanciais das três citocinas. Nesse estudo, os autores sugerem que o desequilíbrio na produção de citocinas de pacientes com PCM desempenha um papel na hiporesponsividade à gp43 e na produção acentuada de anticorpos desses pacientes [340]. Um outro estudo mostrou que a estimulação de moDCs de pacientes com PCM com gp43 ou uma preparação contendo antígenos liberados de leveduras de *P. brasiliensis* induziam uma reversão da anergia específica aos antígenos *in vitro*, estimulando uma resposta linfoproliferativa. Essa linfoproliferação foi maior quando o estímulo foi feito com moDCs pulsadas com antígenos liberados de leveduras, com aumento significativo de IFN- γ e TNF. Os autores sugerem que uma preparação antigênica mais complexa, como a de antígenos liberados de leveduras de *P. brasiliensis*, poderia ser um melhor indutor da resposta do padrão Th1 protetora do que a gp43 isoladamente [341].

A gp43 tem sido descrita em alguns estudos como estimuladora de uma resposta imunológica de padrão Th1, ou seja, dependente de IFN- γ , que é protetora contra infecção por *P. brasiliensis* (*apud* TRAVASSOS *et al.*, 2004 [342]). No entanto, De Almeida e colaboradores, em 1998, e de Ferreira e Almeida, em 2006, mostraram algo diferente, uma vez que que animais susceptíveis infectados com *P. brasiliensis* e tratados com gp43 purificada [336] ou DCs pulsadas com gp43 [338] apresentavam um significativo aumento na quantidade de fungos no pulmão quando comparados ao grupo controle não imunizado, ocorrendo, assim, uma exacerbação da infecção em camundongos tratados com DCs pulsadas com gp43. Uma explicação plausível pôde ser dada em relação à estrutura da gp43, sugerindo-se que uma parte da molécula impede ou bloqueia uma resposta imunitária apropriada. Essa hipótese pôde ser

confirmada quando 25 peptídeos que abrangiam toda a sequência da molécula gp43 nativa foram usados para estimular células de linfonodos de animais imunizados com gp43. Apenas um peptídeo interno com 15 resíduos de aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN), denominado P10, induziu linfoproliferação. Nesse estudo, o tratamento dos camundongos infectados com gp43 e P10 levaram a uma significativa redução da carga fúngica [343], o que poderia ser atribuído ao tratamento com CFA, que como mostrado anteriormente por nós, induz forte proteção em modelo de PCM em camundongos [312]. O efeito protetor de P10 é atribuído principalmente a uma resposta imunitária celular mediada por IFN- γ e um padrão de resposta Th1. Embora essa resposta também pareça ser induzida com gp43, nesse caso, veio acompanhada da produção de anticorpos, atribuída à ativação de um padrão misto de resposta imunológica, Th1 e Th2 [343].

O peptídeo P10 tem sido considerado como um candidato a imunoterápico contra PCM tendo como base algumas de suas características, tais como: sua sequência é conservada nas moléculas de gp43 de diferentes isolados [344], possivelmente pode ser apresentado por moléculas H-2 de diferentes haplótipos [343] e por diferentes moléculas de HLA-DR [345]. Além disso, um análogo do P10 com 13 resíduos de aminoácidos (M10) protegeu animais sem a necessidade do CFA [346] e mostra-se protetor ao ser administrado juntamente com antifúngicos, produzindo uma redução na carga fúngica nos pulmões e a na disseminação desses micro-organismos para outros órgãos [347]. O peptídeo apresenta rápido *clearance* sanguíneo, com captação acentuada nos linfonodos cervicais [348]. Vale ressaltar que bons resultados também foram obtidos com três tipos diferentes de imunização, quais sejam vacina de DNA com plasmídeo que codifica o peptídeo P10 [349]), DCs pulsadas com o peptídeo [350,351] e peptídeo associado a uma nanopartícula de quitosana [352]. Em uma outra estratégia muito interessante, Jannuzzi e colaboradores mostraram que um ScFv obtido do Mab 7.B12, o qual mimetiza a gp43, modula as respostas imunológicas humoral e celular e apresenta epítomos para células Th e citotóxicas [353]. Tanto os animais infectados e tratados com DCs transfectadas com plasmídeo que codifica esse ScFv [354] quanto aqueles tratados com ScFv encapsulado em nanopartículas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) [355] tiveram uma diminuição significativa da infecção pulmonar e da progressão da doença.

Apesar de o peptídeo P10 ser promissor como um tratamento para PCM, deve-se levar em consideração que sua estrutura primária no ortólogo da gp43 em *P. lutzii*,

a Plp43, mostra alterações significativas em sua sequência, o que em tese impossibilitaria o reconhecimento por células T [356]. Se essa possibilidade for confirmada, pacientes com PCM causada por *P. lutzii* não se beneficiaria dessa imunoterapia, o que poderia ser um problema para áreas endêmicas de *P. lutzii*, tais como Mato Grosso do Sul, Goiás e Amazonas [180,357–361].

Ainda pensando no processo de colonização do tecido do hospedeiro e na biologia dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, nosso grupo aventou a possibilidade de que esses micro-organismos poderiam conter outra(s) lectina(s). Para a pesquisa e isolamento dessa(s) proteína(s), optou-se por uma cromatografia de afinidade em coluna contendo resina imobilizada com fetuína bovina. Tal escolha foi fundamentada na composição da fetuína, uma glicoproteína rica em oligossacarídeos que apresentam ácido siálico. Ácidos siálicos, também chamados de ácidos *N*-acetilneuramínicos (Neu5Ac) correspondem a um grupo diverso de monossacarídeos de 9 carbonos sintetizados por animais. Por serem carboxilados, apresentam carga negativa, estando presentes na extremidade mais externa (terminais não redutores) de cadeias de carboidratos *N*- e *O*-ligados a glicoproteínas e em glicoconjugados associados a lipídios. Esse carboidrato é usado como ligante por uma série agentes patogênicos para colonização e infecção do hospedeiro [362,363]. Ao submeter AgPb à cromatografia em coluna de fetuína-agarose, obteve-se proteínas que se ligaram à resina e foram eluídas com solução de NaCl a 1M. A análise dessa fração ligante de fetuína em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio, ou seja, corrida sob condições dissociantes (SDS-PAGE, do inglês, *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) mostrou que o eluato continha uma proteína principal de 60kDa (Figura 8A), a qual foi denominada proteína ligante de fetuína (FBP, do inglês, *fetuin-binding protein*). FBP apresentou-se mais expressa na linhagem patogênica Pb18, enquanto no isolado pouco virulento Pb265, foi vista uma quantidade extremamente pequena dessa proteína (Figura 8B). BAT, tido como um isolado com virulência intermediária, apresentou um pouco menos de FBP que o isolado Pb18. Nessa época, BAT era considerado um isolado de *P. brasiliensis*, contudo, análises moleculares mostraram que, na verdade, esse era um isolado da espécie *P. restrepiensis* [364,365]. Esses resultados sugeriram que havia uma associação entre a expressão de FBP e a virulência do fungo. Assim, a amostra de FBP da linhagem Pb18 de *P. brasiliensis* foi usada como imunoterapêutico em infecção experimental com *P. brasiliensis*. Para garantir que uma forte resposta antiproteína

fosse desenvolvida, os animais infectados foram tratados com a preparação FBP (25 μ g) emulsificada em CFA, usando-se grupos de animais controle injetados com apenas CFA ou IFA, ambos emulsificados em PBS. Foi inesperado e, ao mesmo tempo, incrível verificar que o efeito benéfico de CFA, observado anteriormente [312], foi completamente revertido com a emulsificação de FBP em CFA (Figura 8C). Os experimentos foram repetidos mais duas vezes, obtendo-se os mesmos resultados [366,367].

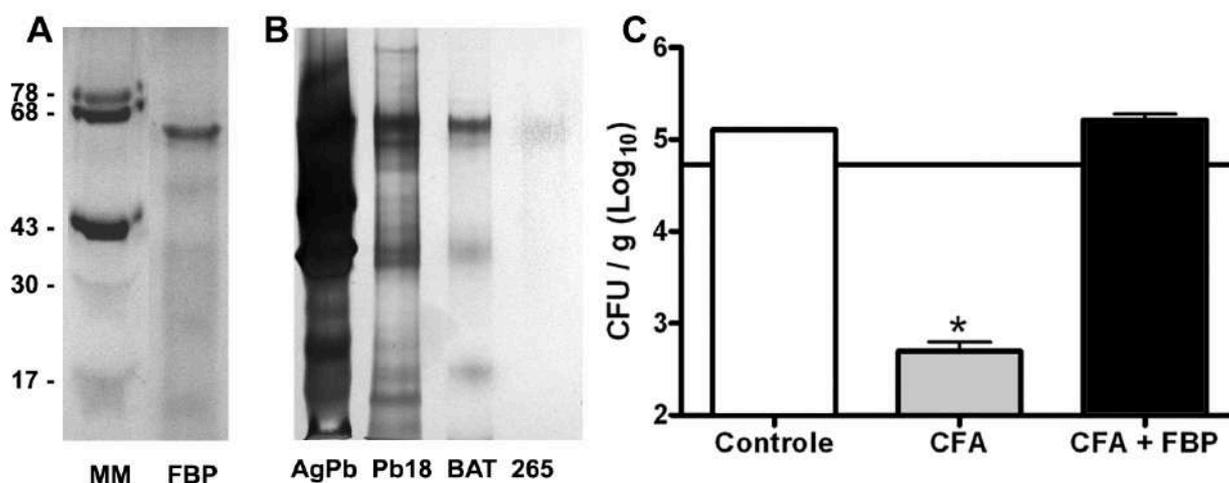


Figura 8. Fração proteica de AgPb ligante de fetuína reverte o efeito benéfico do CFA na infecção experimental com *P. brasiliensis*. (A) AgPb que se ligaram a coluna de fetuína-agarose e foram eluídos com de NaCl a 1M (raia **FBP**) foram reduzidos com 2-mercaptoetanol e submetidos à SDS-PAGE a 12%. MM – raia contendo proteínas com massas moleculares conhecidas. Tais massas estão indicadas à esquerda da figura. (B) As seguintes amostras foram analisadas sob as mesmas condições descritas em “A”. Antígenos somáticos do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (raia **AgPb**). Preparações FBP obtidas dos isolados Pb18 (raia **Pb18**) e Pb265 (raia **265**) e do isolado BAT de *P. restrepiensis* (raia **BAT**). Os géis foram corados pelo método da prata. (C) Camundongos infectados i.v. com 10⁶ leveduras *P. brasiliensis* (Pb18) foram tratados no dia 20 pós-infecção com IFA, CFA ou CFA + FBP. Após 30 dias do tratamento, analisou-se a quantidade de CFU por grama de pulmão. A linha horizontal representa o número de CFU/g de tecido dos animais no dia do início do tratamento (21 dias de infecção). As barras representam as médias \pm DP das CFU. * p < 0,05 em relação às CFU dos demais grupos e o CFU no início do tratamento.

Por ser surpreendente, quando um outro doutorando de nosso grupo começou a trabalhar com FBP, repetiu-se os experimentos de tratamento mais duas vezes e o resultado não mudou, ou seja, a preparação FBP revertia o efeito benéfico de CFA [367]. Apesar de a preparação FBP apresentar uma proteína principal de 60kDa, que compõe 68% de todas as proteínas da amostra, não era possível saber se essa molécula era a responsável pelo efeito observado. Assim, a banda de 60kDa foi separada em SDS-PAGE, recortada do gel e digerida *in situ* com tripsina. Os fragmentos trípticos foram eluídos do gel e submetidos à espectrometria de massa (MS) por meio da análise em nano-LC-MS/MS unidimensional. Os dados obtidos dessa análise foram

submetidos à pesquisa no servidor Mascot para identificar homologia desses peptídeos com sequências primárias de proteínas de *Paracoccidioides* depositadas nos bancos de dados do *The National Center for Biotechnology Information of National of the United States National Library of Medicine* (NCBI/NIH). Dos peptídeos obtidos, 141 parearam com a sequência da proteína de estresse (Hsp, do inglês, *heat shock protein*) de 60kDa de *P. brasiliensis* (PbHsp60) (número de acesso GenBank: XP_010763632.1), resultando em uma cobertura de sequência de 43% [367] (Apêndice 2, artigo 4). Hsps são proteínas evolutivamente conservadas e que funcionam como chaperonas moleculares, desempenhando papéis importantes na homeostase celular, tais como dobramento, desdobramento e montagem de proteínas e prevenção da agregação e desnaturação de proteínas [368]. Além de suas funções de manutenção nas células em condições basais, as Hsps têm sua expressão aumentada e são fundamentais para a sobrevivência celular sob estresse imposto por altas temperaturas, toxinas e condições oxidativas [369]. Em fungos dimórficos, incluindo do gênero *Paracoccidioides*, a expressão de Hsps é aumentada durante a transição de conídios para leveduras [370–372], um evento que pode ser importante na patogênese fúngica quando os conídios atingem os pulmões dos hospedeiros [371]. Em relação à Hsp60 de *P. brasiliensis*, foi mostrado que esta proteína é superexpressa durante a transição morfológica [373] e é reconhecida por soros de pacientes com PCM [374,375]. Apesar das Hsp60s, normalmente, não se comportarem como lectinas, é descrito que uma Hsp60 típica de *E. coli*, a GroEL, apresenta a capacidade de ligar a fetuína [376], sugerindo que, nesse sentido, a PbHsp60 também apresenta tal propriedade. Quando nosso grupo analisou a sequência da proteína *in silico*, o modelamento da proteína gerou uma estrutura tridimensional de Hsp60 de alta de confiabilidade (Figura 9), que exhibe uma notável semelhança com os três domínios do monômero de GroEL – domínios equatorial, intermediário e apical [377].

A partir da determinação de correspondência entre da FBP de 60kDa e PbHsp60, o gene dessa proteína foi clonado de um *amplicon* gerado pela PCR do transcrito reverso de RNAm (cDNA) de *P. brasiliensis* (Pb18) em um plasmídeo de expressão pET28a. Foi produzida proteína recombinante (rPbHsp60) contendo etiqueta de histidina em *E. coli Rosetta* (DE3), que são derivadas da linhagem BL21 (DE3) (Figura 10). A rPbHsp60 estava presente nos corpúsculos de inclusão das bactérias transformadas e induzidas, sendo solubilizada com ureia e isolada por cromatografia de afinidade com resina contendo níquel imobilizado.

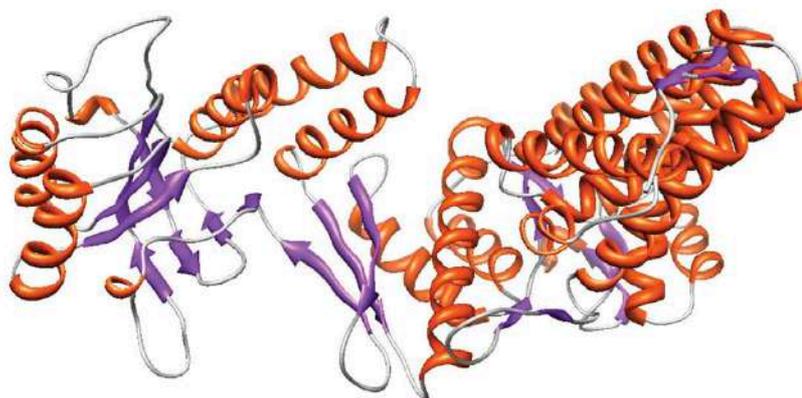


Figura 9. Estrutura tridimensional da Hsp60 de *P. brasiliensis*. O melhor modelo da estrutura 3D da proteína Hsp60 de *P. brasiliensis* da linhagem Pb18 obtido pelo programa Modeller9v2, com base no alinhamento com a proteína 1WE3A. Em laranja estão as α -hélices e em lilás, as β -folhas.

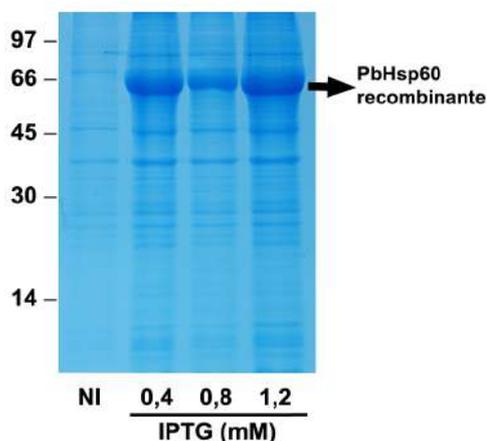


Figura 10. Análise da expressão de rPbHsp60 em *E. coli*. Amostras de bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta (DE3) transformadas com pET28a-HSP60_PB18 foram induzidas ou não com IPTG, por 6 horas, a 37°C, e submetidas à SDS-PAGE a 12%. As raias **0,4**, **0,8** e **1,2** indicam as concentrações em milimolar de IPTG usadas para induzir a expressão das proteínas recombinantes. O controle negativo da indução está identificado como NI. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue. As MM (kDa) de marcadores da migração proteica conhecidas estão marcadas à direita da figura.

Após remoção da ureia das preparações de rPbHsp60 por diálise, essas foram empregadas para obtenção de anticorpos policlonais específicos em camundongos, os quais foram usados para localizar a PbHsp60 em *P. brasiliensis*. A análise da micrografia obtida por microscopia imunoelétrica de transmissão revelou que além da esperada localização citossólica de PbHsp60 em hifas e leveduras (Figura 11), essa também estava localizada na parede celular das leveduras (Figura 11, painéis B e C).

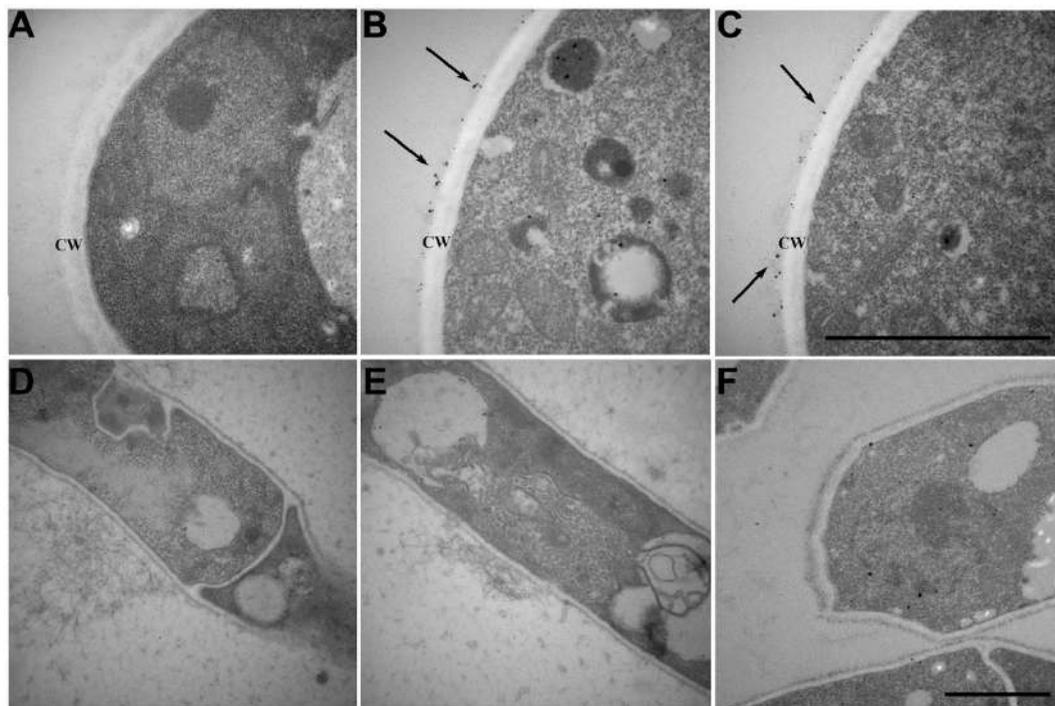


Figura 11. Localização subcelular de Hsp60 em *P. brasiliensis* por microscopia imunoelétrica. (A-C) Leveduras e (D-F) hifas de *P. brasiliensis* foram cultivadas a 37°C e 25°C, respectivamente, por 7 dias. As amostras foram fixadas e incubadas com (A e D) soro pré-imune ou (B, C, E e F) anticorpo policlonal contra rPbHsp60. As setas mostram a PbHsp60 na parede celular (CW) de *P. brasiliensis*. Barra de escala = 2μm.

Ao se investigar a expressão relativa do RNAm para PbHsp60 em *P. brasiliensis*, observou-se que em leveduras há um aumento substancial nas quantidades relativas do RNAm de Hsp60 em relação às hifas e uma expressão intermediária em formas transicionais (Figura 12). Esses resultados foram interessantes porque mostram a maior expressão de PbHsp60 na forma parasitária do fungo, estando presente na parede dessas leveduras, assemelhando-se ao que ocorre com a Hsp60 de *H. capsulatum* (HcHsp60), que possui alta identidade com a PbHsp60 [374] e é encontrada na superfície de leveduras [378]. Embora não tenha sido avaliado a interação de PbHsp60 com macrófagos, as similaridades entre essa e HcHsp60 permitem supor que PbHsp60 na parede de *P. brasiliensis* também se liga à integrina CD18/CD11b de macrófagos, como mostrado para *H. capsulatum* [378].

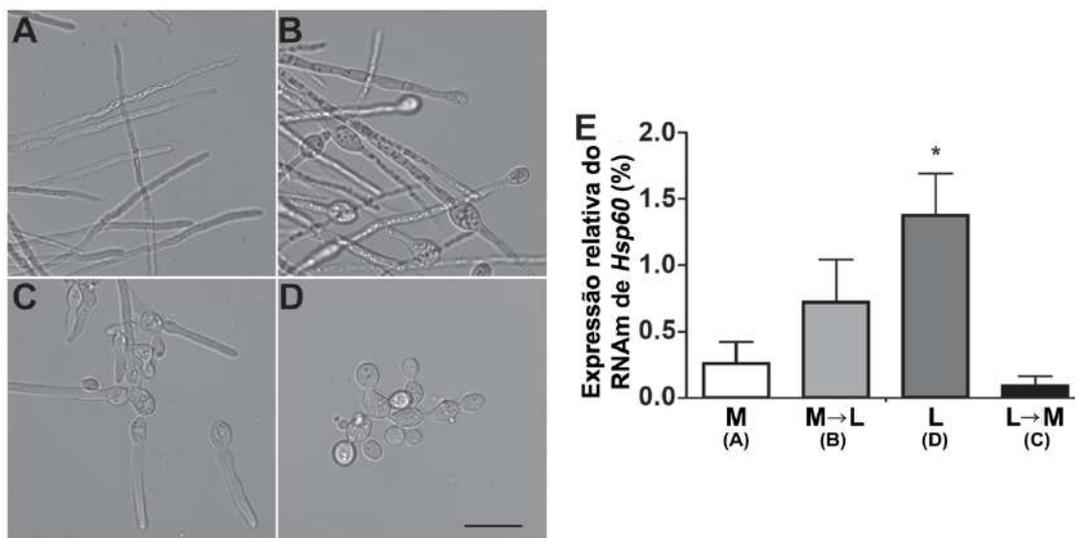


Figura 12. Expressão diferencial do RNAm da HSP60 nas diferentes morfologias e fases de transição de *P. brasiliensis*. Microscopia óptica (A) de micélio, (B) da forma transicional micélio-levedura, (C) da forma transicional levedura-micélio e (D) de levedura de *P. brasiliensis*. As barras correspondem a 10µm. (E) Expressão diferencial do RNAm da Hsp60 nas diferentes morfologias e fases de transição realizada por qPCR. A abreviatura M refere-se a forma de micélio, representativa do painel (A), M→L, micélio para levedura, representativa do painel (B), L, levedura, representativa do painel (D) e L→M, levedura para micélio, representativa do painel (C). Os dados são expressos como média ± DP de cinco amostras por grupo. *P < 0,05 em comparação com os grupos M e L→M.

A despeito dos resultados com a preparação FBP terem mostrado que o tratamento com essa amostra tinha um efeito negativo em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, a localização da PbHsp60 na parede do fungo abriu uma expectativa de que essa FBP recombinante pudesse ser importante na interação patógeno-hospedeiro. Por esse motivo, PbHsp60 continuava a ser um alvo potencial a ser explorado do ponto de vista terapêutico, o que foi avaliado ao se tratar s.c. camundongos, no dia 21 após a infecção i.v. com *P. brasiliensis* (Pb18), com 25µg da preparação purificada dessa proteína recombinante emulsificada em CFA. Como controles foram usados animais infectados e tratados com IFA ou CFA emulsificado em PBS. Aos 51 dias pós-infecção, ou seja, 30 dias após o tratamento dos camundongos infectados, como esperado, observou-se que o tratamento com CFA diminuiu a carga fúngica em comparação com IFA. A emulsão de rPbHsp60 em CFA, similarmente ao que ocorria com FBP, aumentou significativamente a carga fúngica nos três órgãos analisados, pulmão fígado e baço, inclusive em relação ao controle da infecção, tratado com IFA (Figura 13). Além disso, pode-se verificar que rPbHsp60 foi o único tratamento que aumentou significativamente a carga fúngica nos três órgãos em relação ao número de CFU obtida no dia do tratamento (dia 21 pós-infecção) (Figura 13, linha tracejada).

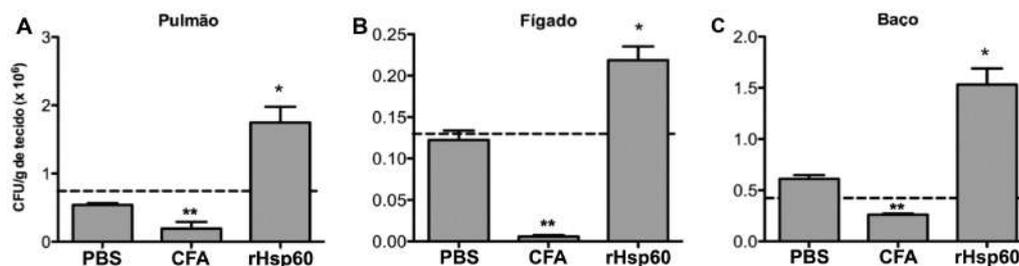


Figura 13. O tratamento de camundongos infectados com *P. Brasiliensis* com rPbHsp60 reverte a protetora exercida por CFA. Camundongos BALB/c foram infectados i.v. com 10^6 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18). Aos 21 dias pós-infecção, os animais foram tratados com IFA emulsificado em **PBS**, PBS em **CFA** (CFA) ou rPbHsp60 (rHsp60) emulsificado em CFA (**rHsp60**). Trinta dias após o tratamento, fragmentos do (A) pulmão, (B) fígado e (C) baço dos animais foram removidos e homogeneizados para análise da quantidade de CFU/g de tecido. A linha tracejada representa a quantidade de CFU/g de tecido aos 21 dias pós-infecção. As barras representam médias \pm DP das CFU/g de tecido. * $P < 0,05$ em relação aos demais grupos. ** $P < 0,05$ em relação aos animais tratados com PBS.

Corroborando esses dados de piora da infecção induzida pelo tratamento com rPbHsp60, a análise histopatológica mostrou que camundongos injetados com rPbHsp60 + CFA tiveram lesões teciduais mais pronunciadas do que camundongos tratados com IFA ou CFA, ambos emulsificados em PBS (Figura 14A), uma observação que foi atestada pela análise morfométrica de lesões granulomatosas nos cortes de pulmão, fígado e baço dos animais infectados: as lesões ocupavam áreas até 50% maiores (Figura 14B).

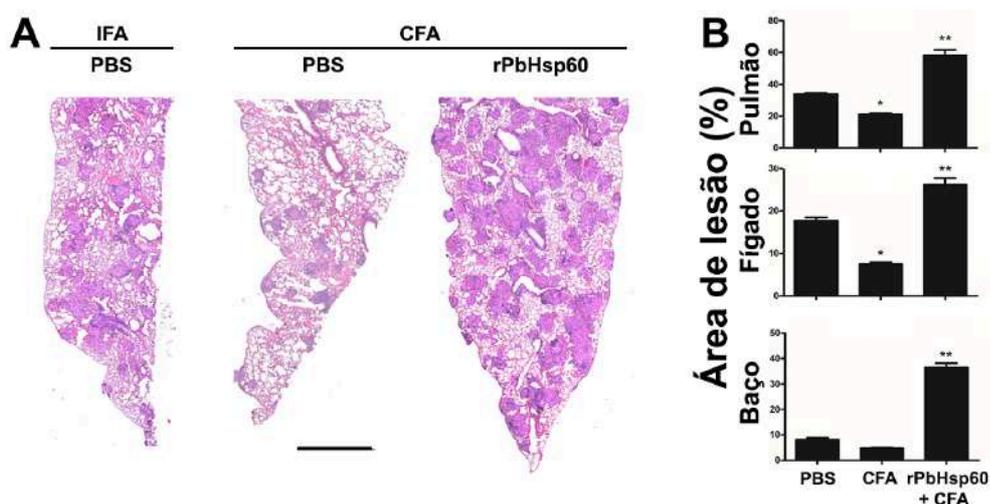


Figura 14. rPbHsp60 reverte o efeito benéfico do CFA na PCM experimental. Camundongos foram infectados como descrito legenda da figura 7 e tratados, no dia 21 pós-infecção, com IFA emulsificado em **PBS** (A), **CFA** emulsificado em PBS (B) ou rPbHsp60 emulsificado em CFA (**rPbHsp60 + CFA**; 50 μ g) (C). Trinta dias após o tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia e o pulmão, fígado e baço dos animais foram emblocados em parafina. Seções de 5 μ m desses órgãos foram coradas com H&E e analisadas microscopicamente quanto às lesões granulomatosas. O painel A mostra imagens representativas capturadas do tecido pulmonar de camundongos de cada grupo experimental. A extensão das lesões inflamatórias (percentagem de área lesionada) foi feita com auxílio do software Image J (painel B). As barras representam a média \pm DP das áreas percentuais de lesão. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo PBS. ** $P < 0,05$ em comparação aos demais grupos. A barra de escala das seções pulmonares indica 1 mm.

Em relação às citocinas, mostrou-se que em comparação aos camundongos tratados com CFA ou IFA, os pulmões de camundongos tratados com rPbHsp60 ou rPbHsp60 emulsificada em CFA apresentavam maiores concentrações de todas as citocinas avaliadas (Figura 15). Essas concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, TNF- α e IFN- γ), provavelmente, agravaram a infecção, levando a inflamação grave, dano tecidual do hospedeiro e formação prejudicada de granulomas [367]. Embora as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β possam prevenir o dano inflamatório [379], parece que ambas guardam uma correlação com a imunossupressão observada na PCM [380]. Além disso, a produção desregulada de citocinas pode ser um problema sério como observado em outras doenças, tal como na síndrome do choque séptico [381]. Nessa síndrome, embora as citocinas anti-inflamatórias sejam produzidas para compensar os altos níveis de resposta inflamatória, elas podem ser prejudiciais, levando a anergia cutânea, redução de linfócitos, diminuição da resposta de monócitos à estimulação de citocinas, bem como diminuição de antígenos leucocitários humanos em monócitos [382].

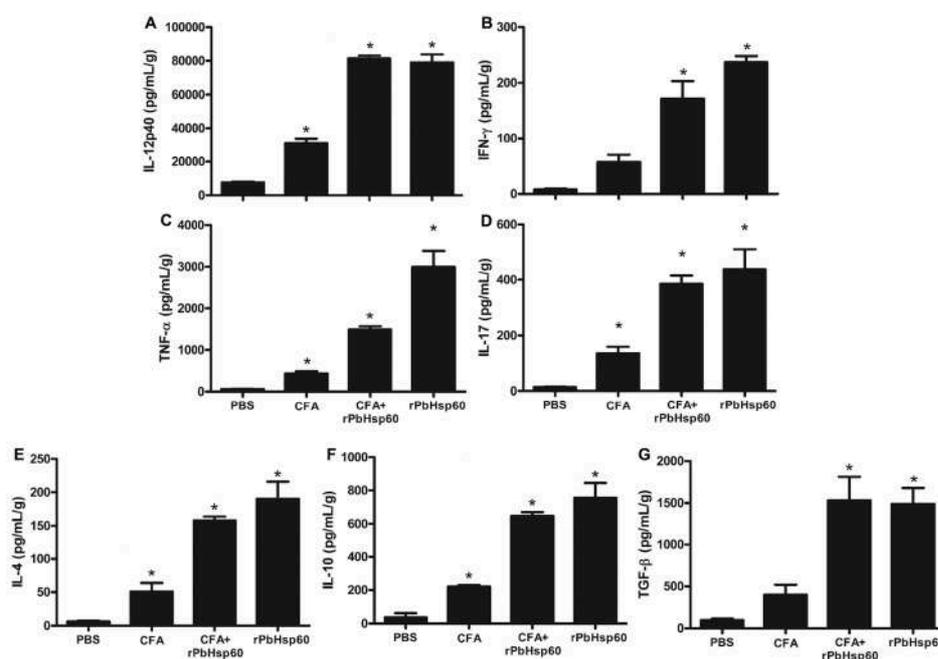


Figura 15. Perfil de citocinas de camundongos infectados e tratados com rPbHsp60 emulsificada ou não em CFA. O tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com rPbHsp60 emulsificada ou não em CFA aumenta a concentração de todas as citocinas testadas. Camundongos foram infectados como descrito legenda da figura 7 e tratados, no dia 21 pós-infecção, com PBS, PBS emulsionado em CFA (CFA), rPbHsp60 em PBS (rPbHsp60) ou emulsionado em CFA (PbHsp60 + CFA). Os homogeneizados pulmonares obtidos desses camundongos no dia 30 após o tratamento foram analisados quanto às concentrações de (A) IL-12, (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-17, (E) IL-4, (F) IL-10 e (G) TGF- β . Os dados são expressos como a média \pm DP de cinco camundongos por grupo obtidos de três experimentos independentes; *P < 0,05 em comparação com os outros grupos.

Foi intrigante notar que nossos resultados divergiam daqueles provenientes de outros estudos que avaliaram Hsps na PCM experimental. Quando Soares e colaboradores [383] usaram rPbHsp60 como vacina (profilática), obteve-se proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*, com uma indução de resposta imunológica protetora, que resultou em carga fúngica e taxa de mortalidade menores quando comparadas aos grupos controles imunizados com albumina sérica bovina (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*). Esse estudo, à primeira vista, apresenta resultados discrepantes quando comparados aos resultados do nosso grupo, descritos acima [367]. No entanto, acreditamos que essa comparação não pode ser feita de um modo direto devido as diferenças de protocolos. Primeiramente, pelo fato de as respostas às vacinas profiláticas diferirem daquelas obtidas por vacinas terapêuticas [384], tal como a que realizamos. Além disso, esses resultados de Soares e colaboradores (1) foram obtidos com Hsp60 recombinante de *P. lutzii*, (2) em um protocolo de duas imunizações (3) usando antígeno emulsificado em adjuvante Ribi (composto de MPLA e dicorinomicolato de trealose em suspensão água-esqualeno-Tween 80), o que contrasta com nosso protocolo onde os animais foram tratados com rPbHsp60 emulsificada em CFA em uma única dose [367]. Apesar das diferenças entre esses dois tipos de protocolos, não se pode desconsiderar a PbHsp60 como um alvo terapêutico, ainda mais que Thomaz e colaboradores, em 2014, [385], usando uma imunoterapia com mAb contra uma Hsp60 de *H. capsulatum*, conseguiram resultados satisfatórios no tratamento da infecção com *P. lutzii* em camundongos.

Pensando sobre nossos experimentos com PbHsp60, vislumbrou-se que outra forma de entrega do antígeno e mais doses terapêuticas, ao invés e apenas uma única, poderiam impactar positivamente na resolução da infecção. Ao se fazer uma busca na literatura, foi encontrado um estudo de Ribeiro e colaboradores (2010) [386], no qual usaram uma formulação contendo plasmídeo que codifica *in vivo* a Hsp65 de *M. leprae* (pVAX1-*ML_HSP65*) como terapia contra infecção i.v. experimental com *P. brasiliensis*, vacina essa que mostrou um efeito excepcional quando usada de modo profilático e terapêutico em infecção experimental com *M. tuberculosis* em camundongos [387]. Ribeiro e colaboradores obtiveram bons resultados ao tratarem camundongos BALB/c, 30 dias após infecção com *P. brasiliensis*, com quatro doses da formulação de pVAX1-*ML_HSP65*, por via intramuscular (i.m.), em intervalos de 2 semanas, mostrando um aumento significativo de citocinas Th1 acompanhadas de

redução da carga fúngica e da lesão pulmonar quando comparado a formulação controle (plasmídeo vazio, sem inserto), 15 dias após a terapia [386].

As vacinas de DNA são muito interessantes por não induzir imunidade antivector e, portanto, podem ser utilizadas em regimes de iniciação e reforço e com vários produtos destinados ao mesmo paciente. Além disso, a confecção dessas vacinas gênicas é muito mais fácil e rápida do que algumas outras plataformas alternativas de vacinas, sendo bem toleradas e tendo um bom perfil de segurança em investigações clínicas humanas, sem problemas de segurança, tal como integração do DNA no genoma do hospedeiro, tolerância ao antígeno ou autoimunidade [388]. Aventando-se que uma vacina de DNA poderia ser uma boa forma de entrega do antígeno *in vivo*, realizou-se a construção da vacina com clonagem do gene da PbHsp60 no vetor pVAX1 (pVAX1-Pb_HSP60). Para esses experimentos, os camundongos foram infectados via intratraqueal (i.t.) para se aproximar um pouco mais da rota natural de infecção, com 3×10^5 leveduras. Quando camundongos infectados com *P. brasiliensis* foram tratados com uma dose única de 100µg de pVAX1-Pb_HSP60, a construção não produziu alteração no quadro infeccioso quando comparado aos animais apenas infectados (PBS) ou os tratados com plasmídeo vazio, o que contrastou com a terapia com a rPbHsp60 (Figura 16).

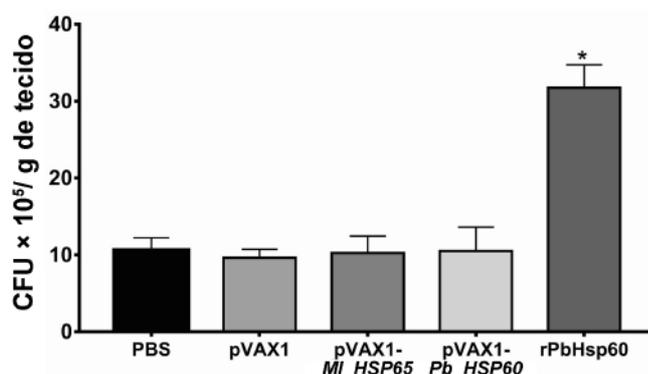


Figura 16. A terapia de dose única com pVAX1-Pb_HSP60 em camundongos infectados por *P. brasiliensis* não induziu alteração na carga fúngica. Camundongos BALB/c foram infectados por via i.t. com 3×10^5 leveduras *P. brasiliensis* e após 21 dias divididos em 5 grupos. Os grupos de camundongos foram tratados com PBS ou vetor vazio (pVAX1) como controles, pVAX1-Pb_HSP60, pVAX1-MI_HSP65 ou rPbHsp60. No dia 30 pós-tratamento, os camundongos foram sacrificados, os pulmões foram removidos e os fragmentos de tecido foram homogeneizados para contagem de CFU. As barras representam a média \pm DP do número de CFU/g de tecido pulmonar. *P < 0,05 em relação aos grupos de controle PBS e pVAX1.

Esse foi um resultado interessante que mostrou que apesar da preparação não induzir melhora no quadro infeccioso, também não prejudicava como visto com a proteína

recombinante. Essas diferenças podem ser decorrentes da forma na qual a proteína é capturada pela célula, o que provavelmente levou a uma liberação exacerbada de citocinas, tais como IL-17, IL-6 e IL-10, o que não foi visto com a vacina de DNA (dados mostrados por Souza *et al.*, 2019 [389]). Mais importante foi notar que a aplicação terapêutica da construção plasmidial em três doses produziu diminuição de carga fúngica e de lesões pulmonares quando comparada a apenas infectados ou tratados com plasmídeo vazio (Figura 17A e 17B, respectivamente). Essa forma de entrega de antígeno com plasmídeo causou uma significativa melhora no controle da infecção e permitiu questionar se o mesmo aconteceria com a proteína recombinante. Inesperadamente, três doses da proteína diminuiu a carga fúngica e as lesões em comparação aos controles (Figura 17A e 17B, respectivamente), mostrando que o número de doses influenciou a infecção resultante [389]). O tratamento com VAX1-*PbB_HSP60* aumentou as concentrações de citocinas inflamatórias IL-6, bem como IFN- γ e IL-17 (Figura 17, painéis D, F e H), o que corrobora a noção de que respostas Th1 e TH17 tem papel importante no controle da infecção. Pelo fato das citocinas IL-6 e IL-17 estarem aumentadas em camundongos tratados com uma dose e três doses, é possível que o efeito anti-inflamatório de IL-10 possa ser crucial para o processo infeccioso. Houve um aumento significativo de IL-10 nos animais tratados com uma dose quando comparado aos controles (resultados mostrados em Souza *et al.*, 2019 [389], Apêndice, artigo 6), ocorrendo o contrário em camundongos tratados com três doses de rPbHsp60 quando comparado aos controles (Figura 17E). De fato, o efeito antagônico de IL-10 a respostas com IFN- γ e TNF tem sido bem documentado [390,391] e sua ação com TGF- β parece participar da evasão do fungo ao sistema imunológico, sendo associada às formas graves da PCM [209,252,392]. O efeito benéfico da preparação pVAX1-*Pb_HSP60* ficou ainda mais claro quando três doses dessa preparação foram usadas para tratar um grupo de 10 animais que tinham sido infectados por via i.t. com uma dose letal de 3×10^7 leveduras de *P. brasiliensis*. Nenhum dos animais morreu durante o período analisado de 100 dias enquanto todos os demais tratados com PBS ou pVAX1 sucumbiram até o dia 86 após a infecção (Figura 18).

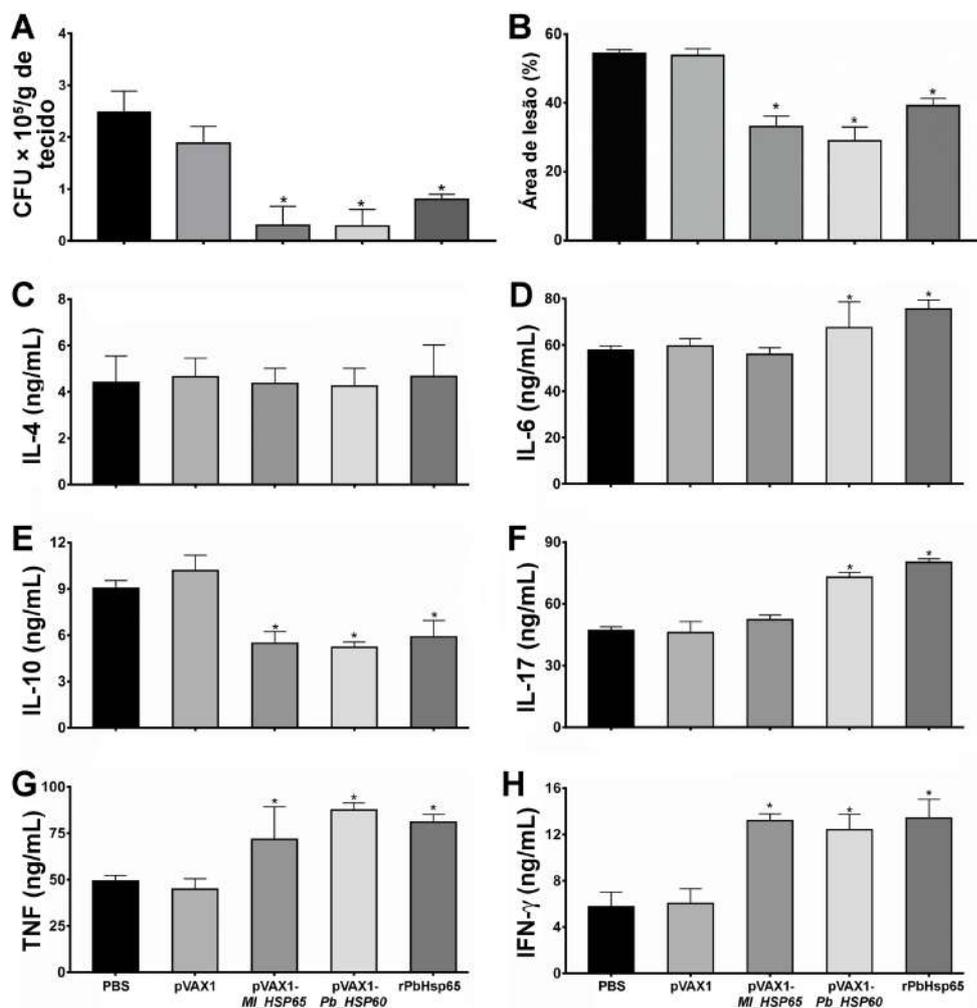


Figura 17. Tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com três doses de pVAX1-*Pb_HSP60* induz redução da carga fúngica pulmonar e das áreas lesionadas, aumento de citocinas inflamatórias e diminuição de IL-10. Camundongos BALB/c foram infectados, como descrito na legenda da figura 15, e injetados no dia 21 pós-infecção com PBS, pVAX1 (vetor vazio, sem inserto), pVAX1-*Ml_HSP65*, pVAX1-*Pb_HSP60* ou rPbHsp60, em intervalo de 15 dias entre cada tratamento. No dia 30 pós-tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões foram removidos para (A) contagem de CFU/g de tecido, análise histopatológica e (B) quantificação de lesão e (C-H) dosagem de citocinas. A extensão das lesões inflamatórias (percentagem de área lesionada) foi feita com auxílio do software Image J (painel B). As barras representam a média \pm DP do número de CFU/g de tecido pulmonar, área de lesão e quantidade de citocinas. *P < 0,05 em relação aos grupos de controle PBS e pVAX1.

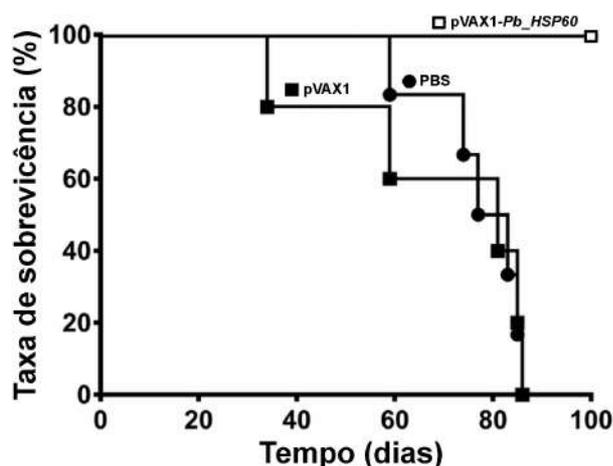


Figura 18. Tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com três doses de pVAX1-Pb_HSP60 evita que os animais sucumbam à infecção letal com *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados por via i.t. com 10 μ L de uma suspensão de 3×10^9 leveduras *P. brasiliensis* por mililitro e tratados após 21 dias com três doses s.c. de PBS, vetor vazio (pVAX1) ou pVAX1-Pb_HSP60, em intervalo de 15 dias entre cada tratamento. Os animais foram monitorados diariamente por 100 dias de infecção.

Na PCM, várias glicoproteínas de superfície de *Paracoccidioides*, incluindo antígenos para diagnósticos podem ser alvos terapêuticos por meio de imunidade passiva com anticorpos. Os mAbs contra gp43 [393], gp70 [394] e fosfatase ácida de 75kDa de *Paracoccidioides* spp. [395] e Hsp60 de *H. capsulatum* [385] mostraram-se eficientes em diminuir a carga fúngica de animais infectados com *Paracoccidioides* spp. quando tratados com esses imunobiológicos. No caso da transferência passiva do mAb contra gp70, além de diminuir a quantidade de fungos, os autores mostraram que não havia granulomas nos pulmões e sugerem que a proteína no fungo facilitaria o estabelecimento da micose e a progressão das lesões na infecção primária [394]. Já para a fosfatase ácida, o processo de imunização foi feito com leveduras previamente opsonizadas com o mAb contra essa proteína. Quando comparados aos controles injetados com PBS ou com mAb irrelevante, houve uma significativa redução de CFUs nos animais que foram submetidos à transferência passiva com o mAb antifosfatase ácida três dias antes da infecção ou sete dias após a infecção. Os autores relatam que a análise histopatológica revelou pouca inflamação nos pulmões, não sendo possível detectar granulomas e fungos nesse órgão. Não se observou diferença significativa na carga fúngica em relação aos controles quando os animais foram tratados 15 dias após a infecção [395].

Diferente dos trabalhos acima, Thomaz e colaboradores, em 2014, [385], usaram mAb contra uma Hsp60 de outra espécie de fungo, *H. capsulatum*, como imunoterapia e conseguiram resultados satisfatórios no tratamento de camundongos

infectados com *P. lutzii*. Essa estratégia se mostrou muito interessante, uma vez que mAbs dirigidos para moléculas originadas de genes ortólogos, ou seja, proteínas com alta similaridade que estão presentes na superfície de diferentes fungos que causam micoses profundas, poderiam ser uma terapia com um espectro de atuação mais abrangente. Esse método de tratamento também tem sido proposto para a Hsp90, presentes na superfície do fungo, sendo mostrado que há a opsonização de *Paracoccidioides* spp. via anticorpos contra essas Hsp, facilitando a fagocitose via macrófagos [396].

A imunização passiva com anticorpos também tem sido avaliada em relação à antígenos lipídicos. Em um estudo, foram usados anticorpos policlonais contra glicolipídeos purificados a partir do extrato lipídico bruto de *P. brasiliensis* em esquemas de tratamento profilático e terapêutico. Nesse último, os animais foram infectados i.t. e tratados por via intraperitoneal (i.p.), 30 dias após a infecção, com 1 mg do anticorpo. Nos tempos de 15 e 30 dias pós-terapia, os camundongos tratados com anticorpos antiglicolipídeos tiveram uma diminuição significativa da carga fúngica pulmonar quando comparados aos controles que receberam anticorpos policlonais controle contra BSA. Com relação às citocinas, 30 dias após a terapia, os animais tratados com anticorpos antiglicolipídeo apresentaram maiores concentrações de IFN- γ , IL-12 e IL-4 quando comparado ao grupo tratado com anticorpos policlonais controle contra BSA. Não houve diferença significativa para outras citocinas testadas como TNF e IL-10. Quando os animais foram analisados 15 dias após o tratamento, as concentrações de todas as citocinas testadas não foram significativamente diferentes. Esse trabalho mostrou possibilidades de que a imunoterapia pela transferência passiva de anticorpos pode ter alvos não proteicos da superfície das leveduras das espécies de *Paracoccidioides* [397].

Apesar da grande variedade de proteínas que existem nos fungos das espécies de *Paracoccidioides* [398–401], que incluem antígenos para diagnóstico [402], a pesquisa do uso terapêutico dessas moléculas na PCM é, de certa forma, um campo ainda pouco explorado, tanto em relação à quantidade de estudos quanto a essa grande complexidade antigênica desses micro-organismos. Das proteínas de *Paracoccidioides* spp. usadas como vacina terapêutica, além daquelas que se associam a glicanas ou a glicoproteínas (descritas acima), vale mencionar as proteínas Pb27 e Pb40. Fernandes e colaboradores, em 2011 [403,404], mostraram que essas duas proteínas, na forma de recombinantes heterólogas, produziram resultados promissores em camundongos

infectados i.t. com *P. brasiliensis* quando usadas conjuntamente em uma preparação única associada ao adjuvante alúmen. A preparação foi administrada s.c. em camundongos, 30 dias após infecção, com quatro doses da formulação, em intervalos de 2 semanas. Apresentou-se com alta eficácia de proteção contra a infecção, não sendo detectados fungos nos pulmões, fígado e baço, preservando a estrutura tecidual dos referidos órgãos. Ademais, essa terapia levou à indução de altas concentrações de IFN- γ e TNF e pequena quantidade de IL-10 e TGF- β quando comparadas às observadas em camundongos apenas infectados [403,404].

Nosso grupo também tem buscado por antígenos de *P. brasiliensis* potencialmente promissores para o tratamento da PCM. Dois desses antígenos foram descobertos quando buscamos substituir a produção de exoantígenos (ExoAg) do sobrenadante de culturas de *P. brasiliensis* – do meio complexo NGTA para o meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle*) ou Ham's F12, desenvolvido por Ham, em 1965 [405]. Isso ocorreu porque era muito notável a diferença entre as proteínas dos sobrenadantes desses cultivos, isto é, leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas em meio sintético liberavam ExoAg de forma menos variada [406,407] do que os detectados em meio complexo NGTA [402]. A análise eletroforética da amostra de ExoAg obtidos de culturas de *P. brasiliensis* em meio líquido DMEM ou Ham's F12 revelou três bandas, uma principal de aproximadamente 60kDa e duas menos proeminentes de 85 e 90kDa (Figura 19). As três bandas foram digeridas *in situ* com tripsina e seus fragmentos trípticos foram extraídos do gel e analisados por espectrometria de massa (análise unidimensional por nano-LC-MS/MS). A identificação das proteínas foi feita a partir da procura por similaridade como os dados de espectrometria de massa no servidor Mascot (<https://www.matrixscience.com/server.html>) carregado com as sequências de proteínas de *Paracoccidioides* spp. (banco de dados do NCBI/NIH). Foi determinado que a banda de 60kDa correspondia à diidrolipoil desidrogenase (DLD) de *Paracoccidioides* (PADG_06494.1 dihydrolipoyl dehydrogenase) [406]. Essa enzima é encontrada nas mitocôndrias como uma subunidade do complexo piruvato desidrogenase. Esse complexo é responsável pela conversão de piruvato em acetil coenzima A, o qual é um substrato fundamental para o ciclo do ácido cítrico, ou seja, para a geração de energia pela respiração aeróbica [408]. A DLD tem massa molecular predita de aproximadamente 55kDa, o que está muito próximo dos 60kDa determinado por SDS-PAGE (Figura 19), supostamente havendo modificações pós-

traducionais que explicariam essa pequena diferença entre a massa encontrada e a massa predita. Já as proteínas de 85 e 90kDa foram identificadas como parte de uma α -manosidase (AMS) de *Paracoccidioides* (PADG_04148.1 alpha-mannosidase). Sugere-se que as proteínas 85 e 90kDa encontradas no sobrenadante de cultura (Figura 19) sejam, na verdade, produtos de clivagem da AMS, uma vez que essa proteína apresenta massa molecular predita de aproximadamente 124kDa [407].

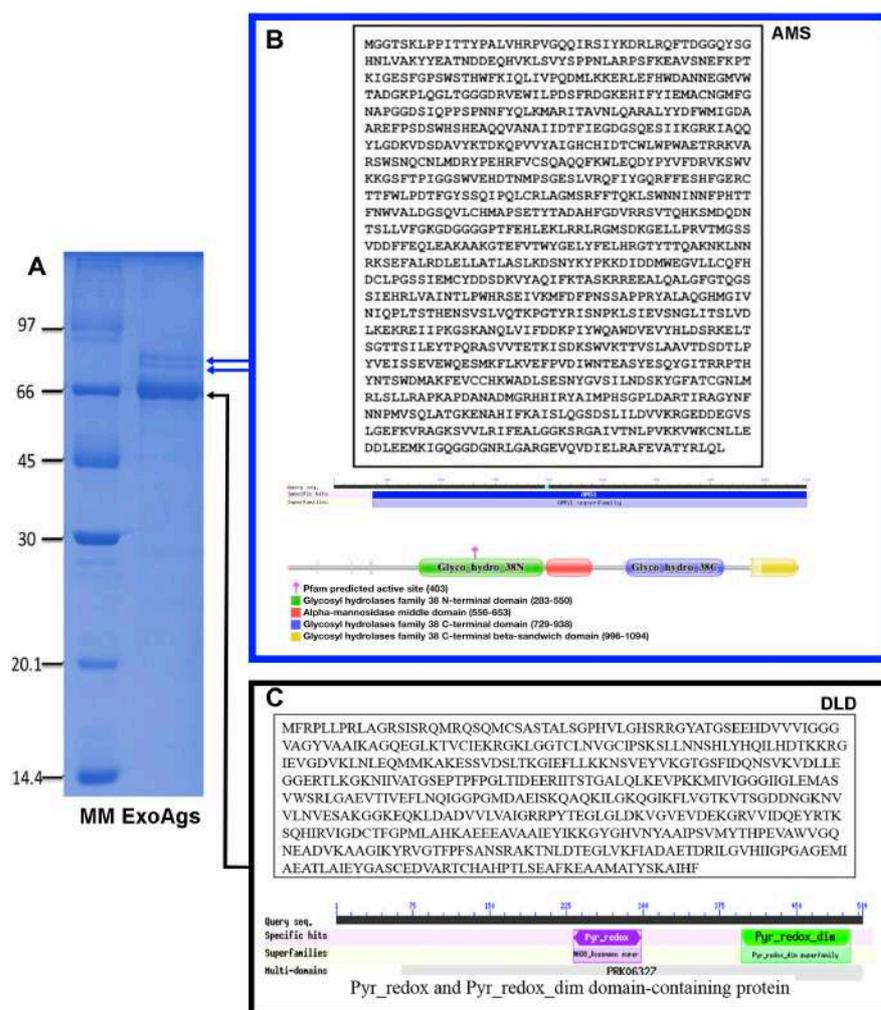


Figura 19. ExoAg da cultura de levedura *P. brasiliensis* em meio sintético HAM's F12. (A) Uma amostra de ExoAg do sobrenadante da cultura de *P. brasiliensis* (Pb18) foi submetida a SDS-PAGE a 10%. MM – Proteínas com massas moleculares conhecidas, descritas à esquerda da figura em kDa, foram usadas como marcadores de migração eletroforética. O gel foi corado com azul de Coomassie. As setas indicam bandas com massa de 60, 85 e 90kDa, que foram submetidas ao sequenciamento de aminoácidos por espectrometria de massa. (B) Sequência de aminoácidos da AMS de *P. brasiliensis* e seus domínios conservados. (C) Sequência de aminoácidos da DLD e seus domínios conservados. A detecção dos domínios contido nessas proteínas foi feita a partir do banco de dados de domínios conservados [CDD] do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) e o arranjo de domínios no *website* Pfam (<https://pfam.xfam.org>).

Em eucariotos existe uma alta diversidade de proteínas glicosiladas com oligossacarídeos *N*-ligados, incluindo enzimas intracelulares e extracelulares,

receptores de superfície, proteínas secretadas, hormônios, imunoglobulinas, bem como proteínas de patógenos que usam a via secretora celular, tal como os vírus [409,410]. As estruturas de oligossacarídeos podem influenciar bioatividade dos polipeptídeos no qual estão covalentemente ligados, assim como seus dobramento, suas localizações e imunogenicidade [411]. Podem também definir as características de adesão a outros glicoconjugados, outras proteínas, complexos macromoleculares e células [412]. As estruturas oligossacarídicas *N*-ligadas a proteínas contém α -D-manopiranosídeos como elemento padrão, ocorrendo a maturação dessas estruturas pela ação de manosiltransferases e α -manosídeses. As α -manosídeses catalisam a hidrólise de resíduos terminais não redutores desses α -D-manopiranosídeos e quando estão envolvidas na maturação de oligossacarídeos associados a glicoproteínas, são agrupadas e denominadas como classe 1, pertencente à família das glicosil hidrolases (GH) 47. Geralmente, essa classe de enzimas é composta de α -1,2-manosídeses de mamíferos e de leveduras que participam da remoção e de resíduos ligados a *N*-glicanas associados a glicoproteínas e remodelamento desses oligossacarídeos *N*-ligados, sendo comum a organelas da via secretora [413].

As α -manosídeses de classe 2, pertencente à família GH38, são associadas à catálise da degradação desses oligossacarídeos de glicoproteínas [414–416] e, de forma geral, tendem a ser mais heterogênea, com membros menos específicos, incluindo proteínas distribuídas por organelas, tais como o complexo de Golgi, lisossomos e em citosol/retículo endoplasmático, as quais removem resíduos de D-manose unidos em ligações α -1,2, α -1,3 [413,417,418]. Todas as manosídeses de classe 2 contêm uma região com sequência conservada relativamente restrita, correspondente aos resíduos de aminoácidos do domínio catalítico na estrutura de processamento [419]. As enzimas desta classe são relativamente grandes, em geral, com massa molecular entre 110 e 135kDa, podendo exigir ou não cátion(s) divalente(s) para a atividade catalítica [417].

Diversos fungos filamentosos secretam manosídeses no meio extracelular, como *Aspergillus* spp. [420–422] e *Penicillium citrinum* [423] e *Trichoderma reesei* [424]. Entretanto, não está elucidada a participação dessas enzimas no processamento extracelular de glicanas. Com relação à relevância biológica dessas enzimas na patogênese fúngica, Mora-Montes e colaboradores, em 2007 [425], mostraram que o processamento de oligossacarídeos *N*-ligados a glicoproteínas por essas enzimas é essencial para a interação fungo-hospedeiro, uma vez que os mutantes dos genes de glicosídeses de *C. albicans*, incluindo as α -manosídeses, apresentaram numerosos

defeitos na parede celular e diminuição da virulência.

As características estruturais de AMS por nós identificada no sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* e o fato dessa molécula ser secretada possibilita sua caracterização como uma α -manosidase de classe 2 (família GH38). Corroboram essas informações, a sua alta similaridade com α -manosidasas dessa classe encontradas nos fungos *A. nidulans* (71% de identidade) e *S. cerevisiae* (AMS₁, α -manosidase vacuolar, 46% de identidade). Se somam a isso outras análises *in silico* feitas por Corrêa e colaboradores, em 2022 [406] (Apêndice 2, artigo 7), as quais sugerem que AMS de *Paracoccidioides* é uma α -manosidase vacuolar de classe 2. Quando estudada bioquimicamente, foi mostrado que a AMS apresentou atividade enzimática ótima no pH 5,6, à temperatura de 45°C e com uma concentração de 3mM do substrato *p*-NP- α -D-manopiranosídeo (dados mostrados por Corrêa *et al.*, 2022 [407]).

Além da descoberta e da caracterização da atividade da AMS nos sobrenadantes das culturas de *P. brasiliensis*, investigou-se expressão gênica diferencial entre hifas e leveduras de fungos cultivados em diferentes meios e, principalmente, em isolados fúngicos com diferentes graus de virulência. Para tanto, foram avaliadas leveduras e hifas de *P. brasiliensis* da linhagem virulenta Pb18 e da pouco virulenta Pb265, além do isolado de virulência intermediária 339 de *P. restrepiensis* (conhecido anteriormente como Pb339). Pelo fato de a atividade enzimática ter sido determinada em culturas de 15 dias, utilizou-se esse mesmo tempo análise da expressão do gene da AMS em *Paracoccidioides*. Como mostrado na figura 20, a expressão foi maior em leveduras do que em micélio nos três isolados que foram cultivados no meio sintético Ham's F12. Por outro lado, quando isolados foram cultivados em meios complexos, YPD e Fava Netto, observou-se um aumento significativo da expressão gênica apenas em leveduras do isolado virulento Pb18, ou seja, não houve diferença significativa na expressão do gene da AMS em leveduras e hifas dos isolados com virulências baixa (Pb265 de *P. brasiliensis*) e intermediária (339 de *P. restrepiensis*) cultivados em meios complexos [407].

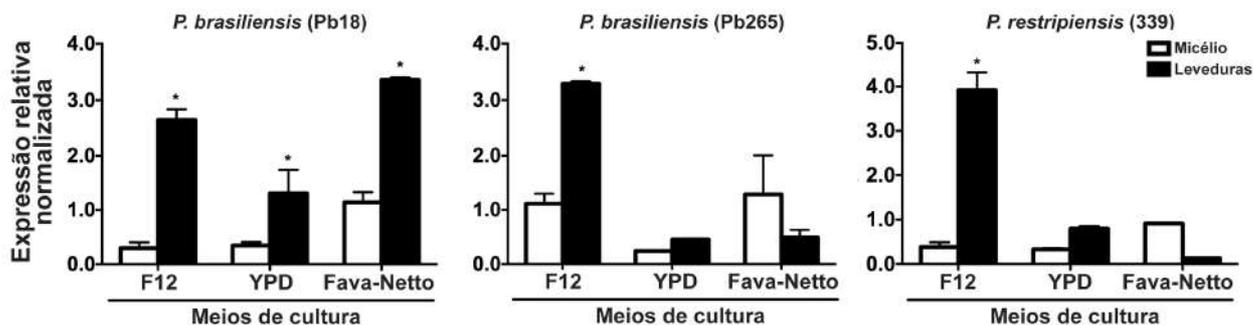


Figura 20. Quantificação relativa normalizada dos níveis transcricionais do gene da AMS de *Paracoccidioides* spp. Os RNAm totais foram extraídos de hifas e leveduras de *P. brasiliensis* do isolados Pb18 e Pb265 e de *P. restrepiensis* (isolado 339) cultivados em meio Ham's F12, YPD ou Fava-Netto. Após a síntese do cDNA, a amplificação do alvo específico foi realizada por qPCR. O asterisco indica $p < 0,05$ em comparação com a expressão micelial dos respectivos isolados. O gene da β -actina foi utilizado como gene de referência e controle endógeno para normalizar a expressão relativa da AMS.

Esses resultados acima mostram que parece haver uma correlação positiva entre expressão de AMS e virulência. Isso é interessante porque a privação nutricional que ocorre quando os fungos são cultivados em meio sintético, tal como o Ham's F12, pode se assemelhar ao que esses enfrentariam no hospedeiro após serem fagocitados por macrófagos. Portanto, se AMS é significativamente mais expressa em leveduras e secretada como um ExoAg de *P. brasiliensis* cultivado sob condições de estresse, essa proteína poderia ser liberada nos tecidos do hospedeiro e constituir uma molécula importante para a infecção por *Paracoccidioides* spp. Experimentos de análise proteômica apontam uma regulação positiva do gene dessa AMS em leveduras recuperadas de macrófagos não tratados com IFN- γ juntamente com os genes de outras proteínas envolvidas com os processos de *N*-glicosilação e remodelamento [200], mostrando que AMS pode participar de um processo de adaptação às condições hostis imposta pelas células hospedeiras. AMS também tem sido encontrada em vesículas extracelulares liberadas por *Paracoccidioides* spp., podendo ter uma ação sobre o sistema imunológico, embora ainda não se tenha consenso se essas vesículas protegem ou aumentam a infecção no hospedeiro [426–430]. Atualmente, nosso grupo está conduzindo experimentos para caracterização funcional da AMS de *P. brasiliensis* e uma investigação dos seus efeitos como alvo terapêuticos na PCM experimental.

Nossos resultados de imunoterapia com MPLA, descritos acima, mostraram que esse adjuvante pode induzir proteção. Embora MPLA não seja considerado um imunógeno, provavelmente, essa molécula derivada do LPS induz um direcionamento de resposta protetora na infecção por *Paracoccidioides*. Assim, nosso grupo buscou determinar qual(is) antígeno(s) das preparações de AgPb e de ExoAg poderiam ser alvo

dessa resposta protetora na terapia com MPLA. Para isso, separou-se por SDS-PAGE as frações antigênicas de *P. brasiliensis*, AgPb e ExoAg, transferindo-se as bandas proteicas para membranas de PVDF. As membranas foram recortadas em três partes de acordo as bandas proteicas visualizadas pela coloração com Ponceau S (Figura 21A). Cada membrana contendo uma das três frações de cada preparação foram adicionadas a placas de cultura de 24 poços, seguido pela incubação com células da linhagem macrofágica J774, por 24 horas, a fim de obter-se processamento e apresentação desses antígenos. Após esse período, foram adicionadas células esplênicas dos animais infectados e protegidos pelo tratamento com MPLA, possibilitando a detecção dos antígenos que geram resposta proliferativa de linfócitos T, o que foi determinado pela positividade para CD3 e Ki67. Como pode ser observado na figura 21B, quando foram usadas as preparações antigênicas totais, somente AgPb induziu uma porcentagem significativa de proliferação de linfócitos quando comparado ao controle. No entanto, quando se avaliou os antígenos separados nas membranas de PVDF, observa-se uma proliferação de linfócitos T excepcional com a fração 2 da preparação de ExoAg. Importante mencionar que esta taxa de proliferação ficou próxima àquela obtida com o controle positivo, a lectina concanavalina (ConA), que é forte indutora de mitose em linfócitos T murinos (Figura 21B).

A fração 2 do ExoAg apresenta a proteína de aproximadamente 60kDa, a qual foi detectada como a mais expressa dessa preparação e identificada anteriormente como a DLD de *Paracoccidioides* (Figura 19). Pelo fato dessa banda induzir maior porcentagem de proliferação de linfócitos T isolados do baço de animais infectados e tratados com MPLA e ser a mais proeminente das proteínas do ExoAg, passou-se a considerá-la como um alvo potencial para imunoterapia. Embora não sejam detectadas outras bandas nessa fração recortada da membrana de PVDF, é conhecido que essa faixa de massa molecular pode abrigar outras proteínas. Assim, não foi desconsiderado que o efeito pudesse ser de outras moléculas, haja vista que a banda poderia ser composta de mais de uma proteína. Por esse motivo, o gene da DLD de *P. brasiliensis* foi clonado e a proteína recombinante (DLDr) expressa para se determinar se era a molécula responsável pela resposta proliferativa e se poderia ser um potencial imunoterápico a ser usado no tratamento da PCM.

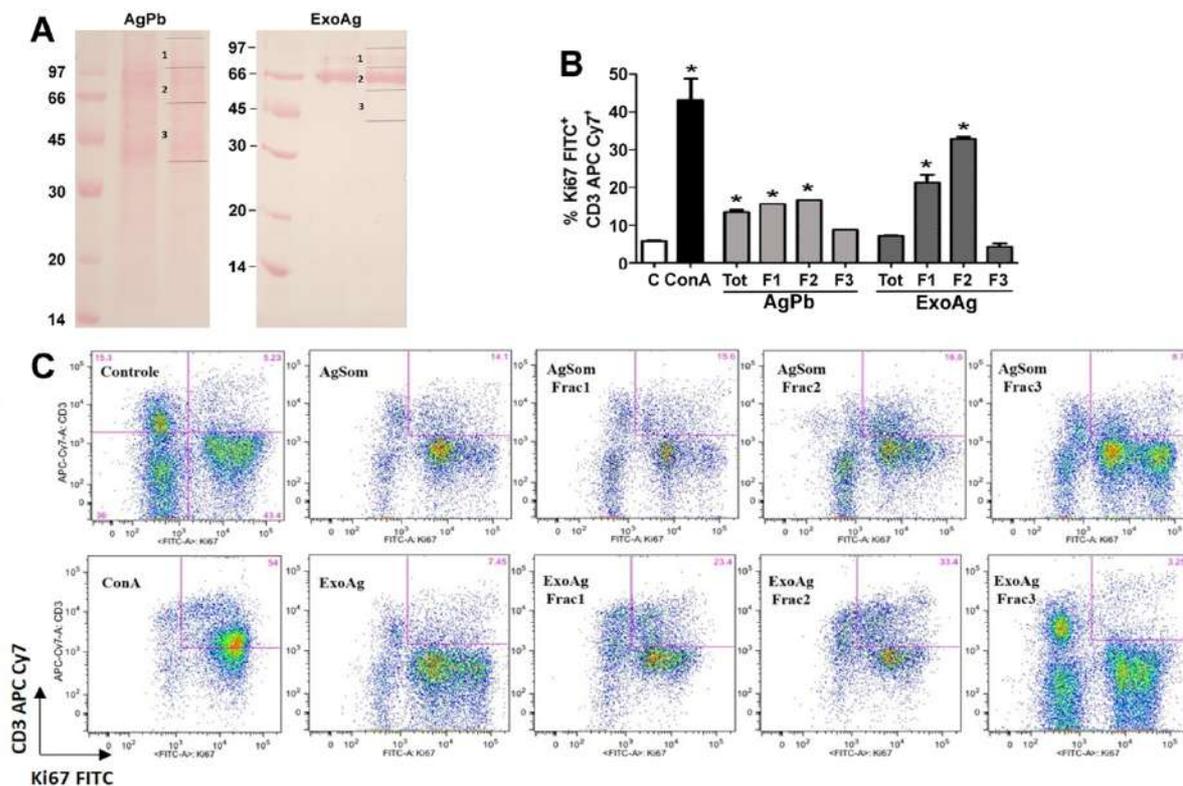


Figura 21. Ensaio de proliferação de células esplênicas de animais injetados com MPLA induzida por AgPb e ExoAg de *P. brasiliensis*. (A) AgPb e ExoAg de leveduras de *P. brasiliensis* foram separados em SDS-PAGE a 12% e transferidos para a membrana de PVDF, as quais foram coradas com Ponceau S. As membranas foram recortadas e três partes, como indicado na 3^a raia das duas membranas. (B e C) As células do baço isoladas de animais infectados e tratados com MPLA, mortos 9 dias após o tratamento, foram cocultivadas com macrófagos de linhagem J774 previamente estimulados com as membranas recortadas, como escrito acima, ou ConA (2µg/mL), como controle positivo. Células não estimuladas foram usadas como controle negativo (C). Tot – antígeno total. F1 a F3 – frações recortadas conforme mostrado no painel A. Após 48 horas de cultivo as células foram marcadas com anticorpos contra CD3 APC-Cy7 e Ki67 FITC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi pela medida de fluorescência de células analisadas por tamanho e granularidade no histograma, dentro da *gate* de células mononucleares. (B) As barras representam valores da média ± DP dos resultados de cada grupo, os quais foram obtidos por análise dos (C) *dot blots*, no quadrante onde as células eram duplo-positivas para CD3 APC-Cy7 e Ki67 FITC. *P < 0.05 em relação ao grupo controle.

Inicialmente, a DLDr foi usada para produção de anticorpos policlonais específicos, a fim de imunolocalizar essa proteína em *P. brasiliensis*. Análises das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de fungos incubados com anticorpos contra DLDr e anticorpos contra IgG de camundongos conjugados com ouro revelaram que a DLD estava localizada na parede celular, nas mitocôndrias e no citoplasma do fungo (Figura 22) [406].

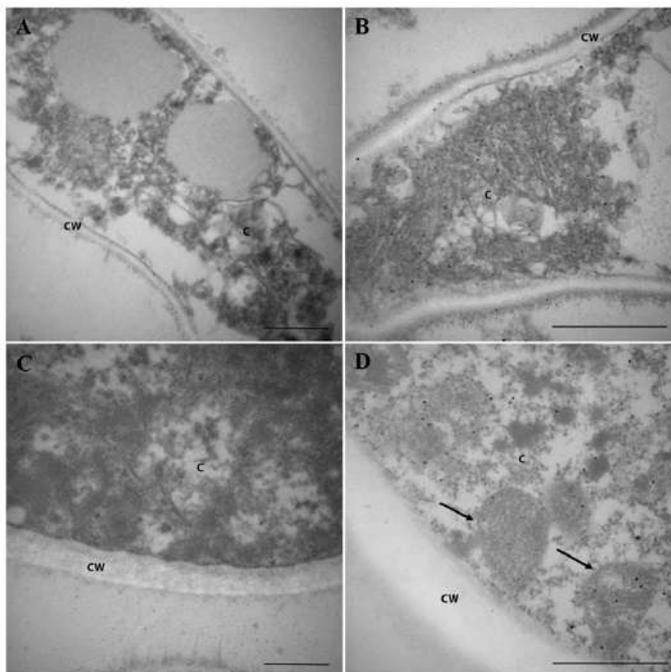


Figura 22. Localização de Pb18_Dld em células de micélios e leveduras de *P. brasiliensis*, visualizada por microscopia imunoeletrônica. (A e B) Hifa e (C e D) levedura de *P. brasiliensis* foram marcadas com anticorpo policlonal primário contra DLD (B e D) ou soro de animais pré-ímmunes (A e C) e anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal. A marcação de DLD foi analisada por microscopia eletrônica. As barras correspondem a 2 μ m. A identificação C correspondem ao citoplasma enquanto CW à parede celular. As setas indicam mitocôndrias.

Além da localização subcelular, determinou-se a expressão diferencial do gene da DLD em micélio, leveduras e nas transições morfológicas de hifa para levedura ou levedura para hifa (Figura 23). Uma alíquota do cultivo de cada morfótipo fúngico foi corada com *Calcofluor white* imediatamente antes da extração do RNAm para análise por microscopia óptica, confirmando as diferentes morfologias das quais o RNA total foi extraído (Figura 23A). Como mostrado na figura 23B, as mensagens para a DLD foram mais expressas quando o fungo estava na sua forma parasitária, levedura, com diminuição nas fases de transição e baixa expressão na forma saprofítica e infectante, miceliana [406].

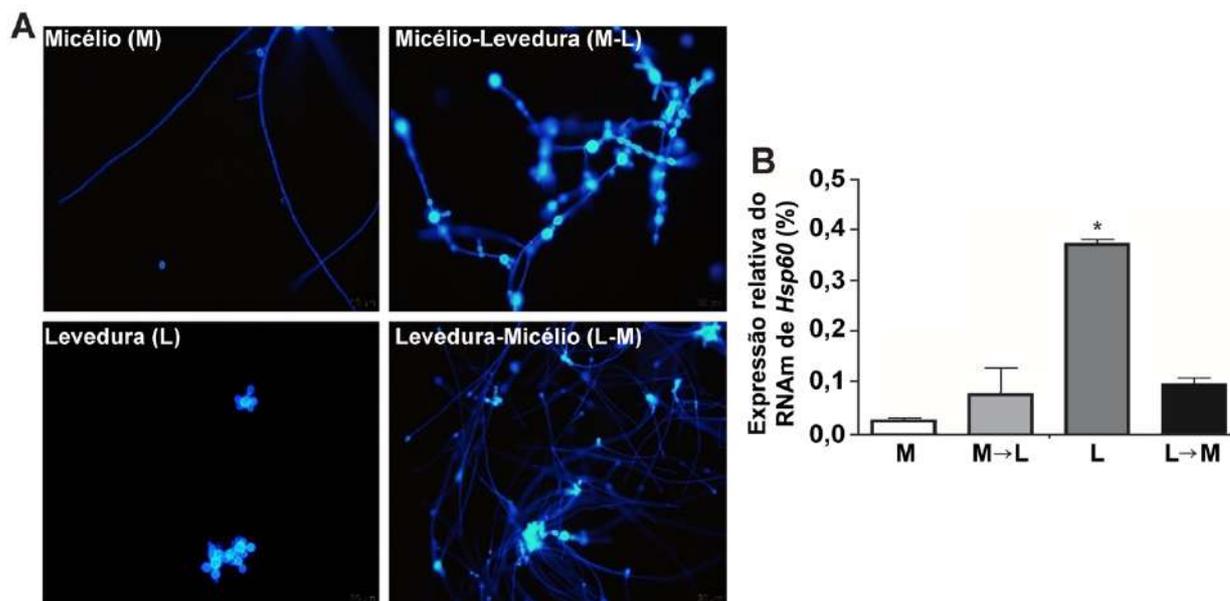


Figura 23. Análise da expressão diferencial de RNAm DLD em micélio e levedura e nas formas de transição de *P. brasiliensis*. (A) A fim de marcar as células fúngicas imediatamente antes da extração do RNAm, incubou-se uma alíquota das culturas contendo micélio, levedura e as formas de transição (micélio-levedura e levedura-micélio) de *P. brasiliensis*, descritas nas imagens de microscopia óptica da figura, com *Calcofluor White Stain* a 1mg/mL, por 1 hora. As imagens foram analisadas a 395/420nm em microscópio de fluorescência, com uma lente ocular de 10x e objetiva de 100x. (B) O RNA total de *P. brasiliensis* cultivado nas diversas formas indicadas na figura foi extraído para transcrição reversa (RT). Os cDNA obtidos pela RT foram usados para quantificação da expressão relativa do gene de DLD por PCR em tempo real. Expressão relativa normalizada refere-se à comparação dos transcritos de DLD com os transcritos dos genes de referência α -tubulina e β -actina de *P. brasiliensis*. O gráfico representa valores da média \pm DP dos resultados de cada grupo em triplicata. *P < 0.05 em relação aos demais grupos.

Um resultado muito interessante foi obtido quando os macrófagos foram estimulados com DLD_r, uma vez que essas células tiveram um aumento na taxa de fagocitose e de atividade microbicida de *P. brasiliensis* em comparação com as células não estimuladas (dados mostrados por Landgraf *et al.*, 2017 [406]). Isso pode ser relevante, desde que a DLD tem sido descrita, em uma análise proteômica, como um ExoAg comum entre as espécies *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis* [431], podendo ser sugerido que sua liberação no hospedeiro poderia fazer parte das moléculas que são importantes para interação fungo-hospedeiro. Além disso, DLD foi identificada em uma análise proteômica de moléculas secretadas por *Cryptococcus* spp., sendo sugerido pelos autores que a secreção dessas moléculas pode estar relacionada à virulência desses fungos [432].

Essa investigação está em andamento, e os resultados apresentados a partir deste ponto ainda não foram publicados e são bastante promissores. Para investigação da DLD como a responsável pelo efeito proliferativo em linfócitos T murinos desencadeados pela fração 2 de ExoAg, visto na figura 21, estimulou-se macrófagos da

linhagem J774 com DLDr ou gp43 recombinante (rgp43), como controle, incubando-se essas células com células esplênicas não aderentes de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com MPLA. Como pode ser observado na figura 24, DLDr induziu proliferação significativa de linfócitos T, visto pela marcação com Ki67, quando comparado ao grupo controle. Em contraste, a proliferação induzida por rgp43 não diferiu significativamente do controle [317]. A resposta proliferativa de DLDr não foi tão robusta quanto da fração F2 dos ExoAg (Figura 21B), podendo existir outra(s) molécula(s) nessa fração que também induz(em) proliferação de células T.

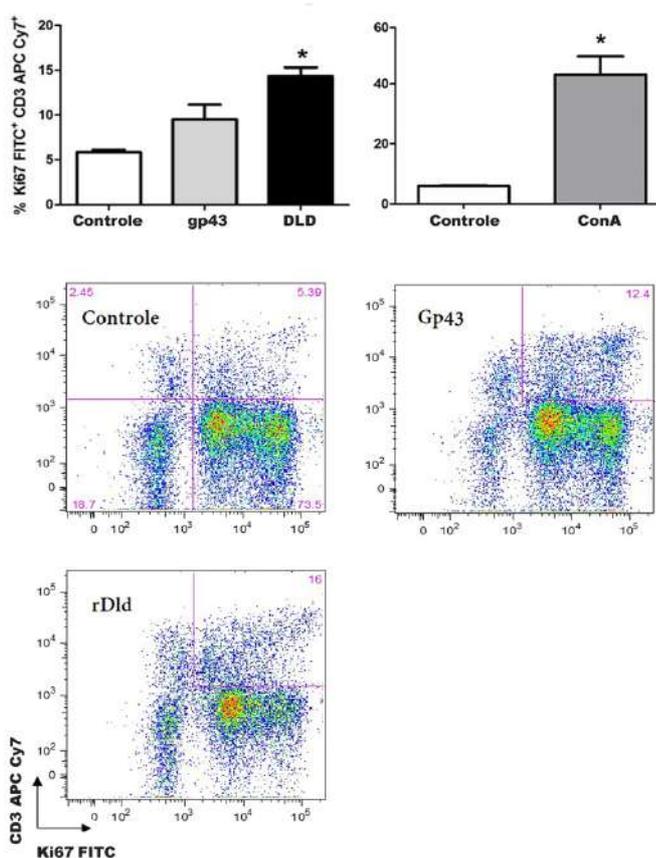


Figura 24. Ensaio de proliferação induzida por proteínas recombinantes de *P. brasiliensis* – DLDr e gp43. Células esplênicas não aderentes (10^6) de animais infectados e tratados com MPLA foram cocultivadas com macrófagos de linhagem J774 (3×10^5) previamente estimulados com as proteínas recombinantes gp43 ou DLDr ou com ConA ($2\mu\text{g}/\text{mL}$), um ativador policlonal de linfócitos T. Células não estimuladas foram usadas como controle negativo (controle). Após 48 horas de cultivo, as células foram marcadas com anticorpos contra CD3-APC-Cy7 e Ki67 FITC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por tamanho e granularidade no histograma, dentro da *gate* de linfócitos. O gráfico representa valores da média \pm DP dos resultados de cada grupo. * $P < 0.05$ em relação ao grupo controle. Ao contrário de gp43, DLDr induz proliferação de linfócitos T esplênico de animais infectados e tratados com MPLA.

Com esses resultados sugestivos de que DLDr induz resposta imunológica que pode ser protetora, avaliou-se se a administração terapêutica dessa molécula

recombinante poderia alterar o curso da PCM experimental. Desse modo, camundongos foram infectados i.t. com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18), sendo usados para realização de dois experimentos compostos de três grupos cada. Todos os animais foram tratados no dia 20 após a infecção. No primeiro experimento, os camundongos receberam PBS (controle), DLD (10 μ g em PBS) ou MPLA+DLD (10 μ g de proteína emulsificada em 20 μ g de MPLA). Já no segundo experimento, foram tratados com PBS (controle), ExoAg do isolado de *P. brasiliensis* cultivados em meio Ham's F12 (20 μ g em PBS) ou MPLA+ExoAg (20 μ g de ExoAg emulsificado em 20 μ g de MPLA). Todos os animais foram submetidos à eutanásia após 30 dias dos tratamentos (50 dias após a infecção). Surpreendentemente, no primeiro experimento, observou-se que a administração terapêutica de DLDr em animais previamente infectados diminuiu significativamente o número de UFC no pulmão desses animais em comparação com o controle. De modo interessante, a administração da proteína associada ao adjuvante não alterava significativamente a carga fúngica quando comparado a proteína recombinante administrada sozinha (Figura 25A). No segundo experimento feito em paralelo, não houve diferença na redução da carga fúngica dos animais tratados com ExoAg em PBS ou emulsificado em MPLA em relação ao controle (Figura 25B).

Quando foi feita a análise das lâminas dos pulmões dos animais que receberam os tratamentos com DLDr emulsificada ou não com MPLA, notou-se que a arquitetura pulmonar estava mais preservada, os granulomas estavam em pequeno número, sendo compactos e bem-organizados. Em contraste e como esperado, numerosos granulomas difusos foram observados no grupo controle (Figura 25C). Quando os experimentos foram realizados com ExoAg ao invés DLDr, o comprometimento pulmonar dos animais tratados com a preparação total de ExoAg não difere muito do controle de infecção, mesmo quando essa preparação foi associada ao adjuvante MPLA (Figura 25D).

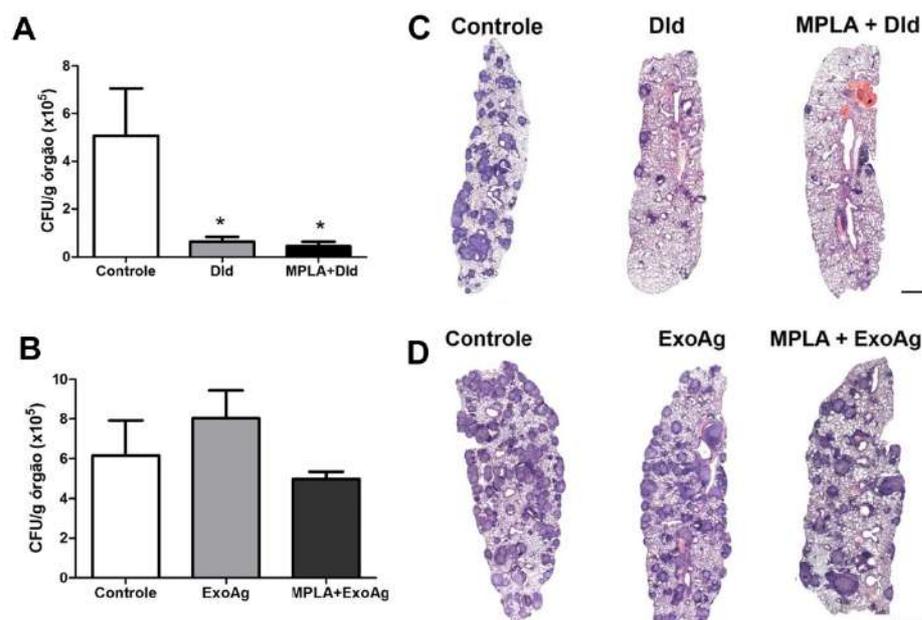


Figura 25. Camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com DLDr tem redução significativa na carga fúngica. Camundongos infectados i.t. com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) foram usados para realização de dois experimentos, compostos de três grupos cada. No primeiro experimento (**A** e **C**), os animais foram tratados no dia 20 após a infecção com PBS (controle), Dld (10 μ g em PBS) ou MPLA+DLDr (10 μ g de proteína emulsificada em 20 μ g de MPLA) enquanto no segundo (**B** e **D**), os animais foram tratados com PBS (controle), ExoAg do isolado de *P. brasiliensis* (20 μ g em PBS) ou MPLA+ExoAg (20 μ g de ExoAg emulsificado em 20 μ g de MPLA). Os animais foram submetidos à eutanásia após 30 dias dos tratamentos (50 dias após a infecção) e os pulmões removidos e processados para (**A** e **B**) quantificação de CFU/g de tecido (após serem homogeneizados) e (**C** e **D**) análises histológicas. (**A** e **B**) No gráfico, as barras representam a média \pm o DP dos resultados de cada grupo. * $P < 0,05$ em relação ao controle. (**C** e **D**) Para a histologia, as lâminas foram coradas com HE. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo programa ImageJ Pro. A escala dos cortes está identificada pela barra à esquerda da figura e corresponde a 1mm.

Ao se analisar o perfil de citocinas induzidas pelo tratamento com a DLDr, emulsificada ou não em adjuvante, observou-se uma diminuição significativa das citocinas IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4 (Figura 26, painéis A, D, E, F e G, respectivamente) para os animais infectados que receberam os tratamentos quando comparados ao grupo controle. Já a produção de IFN- γ e TNF (figura 26, painéis B e C, respectivamente) não foi significativamente diferente do controle. Assim, observa-se baixa produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e das inflamatórias IL-6 e IL-17, em comparação aos animais que não receberam tratamento. A produção de IFN- γ e TNF ainda que induzidas (Figura 26, painéis B e C), não foram significativas em relação ao controle no período avaliado. Sugere-se, assim, que a administração da proteína possa modular a resposta por uma cinética de produção de citocinas diferentes daquelas induzidas pelo adjuvante sozinho. Embora não tenhamos feito a detecção de citocinas em tempos menores de estimulação com a proteína, é possível

que o pico dessas citocinas ocorra alguns dias após a estimulação, sendo que tal resposta poderia estar em declínio no tempo avaliado – 30 dias após o tratamento.

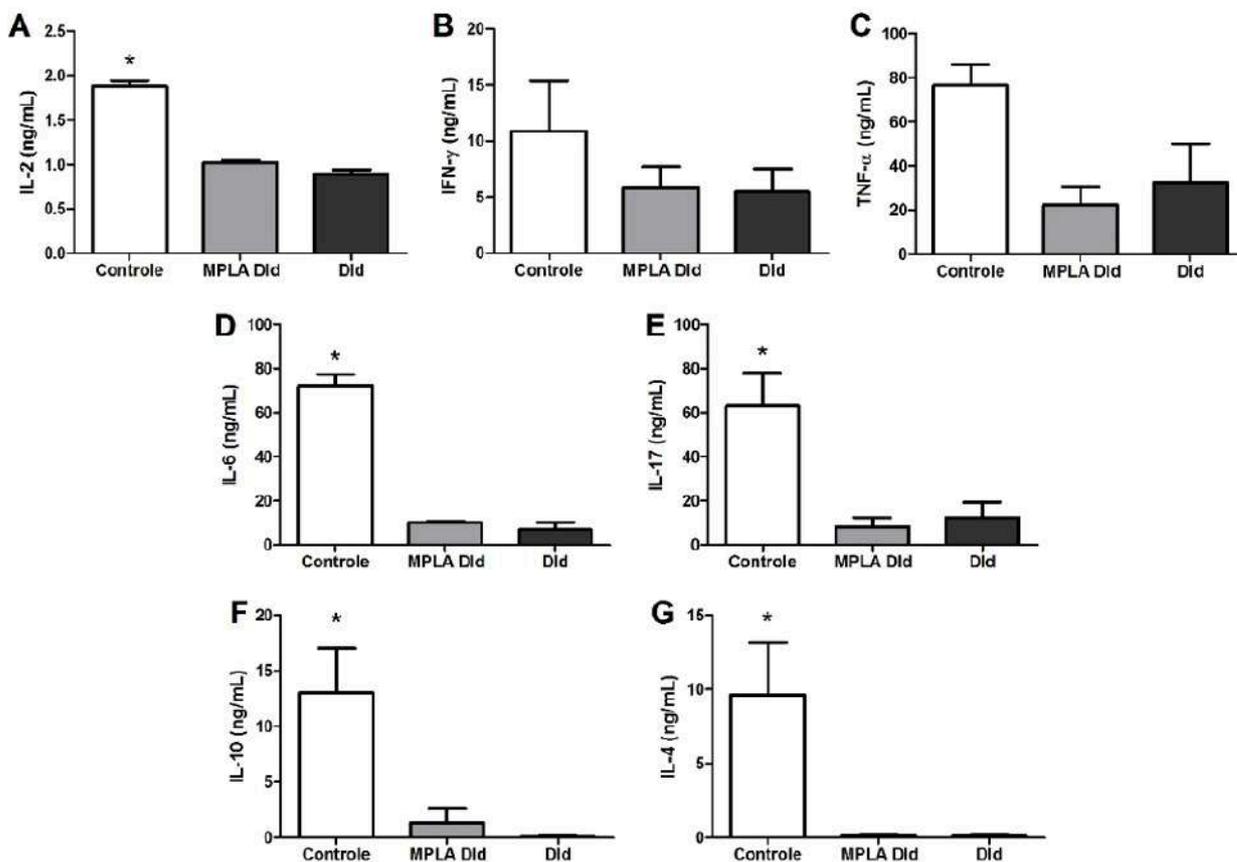


Figura 26. Perfil de citocinas pulmonares de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* e tratados terapêuticamente com DLD emulsificado ou não em MPLA. Camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* foram tratados com PBS (**Controle**), 10 μ g de DLDr emulsificada em 20 μ g de MPLA (**MPLA Dld**) ou somente 10 μ g da proteína em PBS (**Dld**) no dia 20 após a infecção, ou seja, 50 dias após a infecção, a fim de determinar a concentração de (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) TNF, (D) IL-6, (E) IL-17, (F) IL-10 e (G) IL-4. As amostras representam a média \pm DP dos resultados de cada grupo. *P < 0.05 em relação aos demais grupos.

Em conjunto, esses resultados mostram que a administração terapêutica de DLDr induz a um efeito benéfico, diminuindo a carga fúngica dos pulmões e os danos pulmonares causados pelo processo inflamatório decorrente da infecção. É empolgante pensar que DLD (Apêndice 1) e AMS [407] de *Paracoccidioides*, apresentam ortólogos em outros fungos que causam micoses profundas e menor identidade com as proteínas de seres humanos, abrindo a possibilidade de ser produzida uma vacina terapêutica “pan-fúngica”.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imunoterapia engloba uma ampla gama de modalidades de estratégias para tratamento de diversas patologias por modulação do sistema imunológico que vem ganhando muito destaque desde o início do século XXI. Todavia, os estudos mais modernos de desenvolvimento de técnicas e estratégias fascinantes estão mais centrados em oncologia tanto humana [8] quanto veterinária [9], sendo considerada a imunoterapia contra o câncer pelos editores da revista *Science* como a “Revelação do ano” de 2013 [10]. Na esteira desse desenvolvimento estão as imunoterapias usadas para diminuir os sintomas de alergias [147], impedir a rejeição de órgãos transplantados [433] e tratar doenças autoimunes [434] e infecciosas [435]. Neste texto, são mostrados os estudos de imunoterapia para PCM, na sua imensa maioria em fase pré-clínica, dentre as quais se destacam os tratamentos com moléculas de estimulação de imunidade inata, vacinas terapêuticas de subunidade ou gênicas, transferência adotiva de células dendríticas pulsadas com antígenos e imunização passiva com anticorpos e uso de mAb miméticos de antígenos. Atualmente, nas pesquisas de imunoterapia da PCM, existe uma grande lacuna em relação à manipulação da resposta imunológica através do uso de técnicas já pesquisadas em oncologia, como é o caso dos inibidores de ICP específicos das células T, *e.g.* PD-1 e CTLA-4. Essa terapia já tem resultados entusiasmante em pacientes que desenvolveram outras infecções fúngicas invasivas, sendo usado Nivolumab (mAb contra PD-1) em associação com IFN- γ . Em um caso, a paciente desenvolveu sepse por fungo do gênero *Mucor* [436] e em um outro, o paciente com leucemia mieloide aguda teve com a confecção por *Aspergillus* e *Mucor* [437]. Nesses casos de micoses graves não tratáveis, o sucesso do tratamento parece advir da reversão da exaustão de linfócitos T somada à ação do IFN- γ de estimulação de imunidade antifúngica. Tal abordagem, inclusive, tem sido sugerida para pacientes com candidíase invasiva [438].

A pesquisa de imunoterápicos para PCM já existe desde a década de 70, mas, como mostrado aqui, continua pouco explorado em relação às moléculas estimuladoras de imunidade inata e aos inúmeros potenciais antígenos para vacinas terapêuticas. Seria interessante que esse quadro mudasse nos próximos anos e pudéssemos ter mais pesquisadores envolvidos com essa área vibrante e com alto retorno para sociedade, principalmente no Brasil onde se somam o maior número de pacientes e infectados por *Paracoccidioides* spp. Em conjunto, nossos resultados, aqui

apresentados, mostram a contribuição do nosso grupo com estudo de moléculas estimuladoras do sistema imunológico para diminuição da carga fúngica, o que se traduz em uma busca por novos alvos para imunoterapia contra a PCM e, atualmente, por novas abordagens que possam impactar na eliminação do fungo com danos imunopatogênicos mínimos. Apesar de termos alvos terapêuticos bastante promissores, a procura molécula imunoterápica “bala mágica” de Ehrlich, parasitotrópica e não organotrópica [32], continua. Acreditamos que seja possível a encontrar, o que é um dos nossos grandes objetivos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kulwal V, Sawarkar S. Immunotherapy: a concept. In: Sawarkar SP, Nikam VS, Syed S (eds) *Immunotherapy – a novel facet of modern therapeutics*. Cingapura: Springer, 2020, pp. 1–20.
2. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The intriguing history of cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2019; **10**: 2965.
3. Oelschlaeger TA. Bacteria as tumor therapeutics? *Bioeng Bugs* 2010; **1**: 146–147.
4. Greenberg S. History of immunology. In: Paul WE (ed) *Fundamental immunology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp. 22–58.
5. Valent P, Groner B, Schumacher U, et al. Paul Ehrlich (1854-1915) and his contributions to the foundation and birth of translational medicine. *J Innate Immun* 2016; **8**: 111–120.
6. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; **177**: 1572–1573.
7. Freeman J. Further observations on the treatment of hay fever by hipodermic inoculations of pollen vaccine. *The Lancet* 1911; **178**: 814–817.
8. Liu C, Yang M, Zhang D, et al. Clinical cancer immunotherapy: current progress and prospects. *Front Immunol* 2022; **13**: 961805.
9. Regan D, Guth A, Coy J, et al. Cancer immunotherapy in veterinary medicine: current options and new developments. *Vet J* 2016; **207**: 20–28.
10. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer Immunotherapy. *Science (1979)* 2013; **342**: 1432–1433.
11. Magner LN. *A history of medicine*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9781315113814> (2017).
12. Popko L. Some notes on Papyrus Ebers, ancient Egyptian treatments of migraine, and a crocodile on the patient’s head. *Bull Hist Med* 2018; **92**: 352–366.
13. Steinert U. Disease concepts and classifications in ancient Mesopotamian medicine. In: Steinert U (ed) *Systems of classification in premodern medical cultures: sickness, health and local epistemologies*. Londres: Taylor & Francis, 2020, pp. 140–194.
14. Jones AW. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. *Drug Test Anal* 2011; **3**: 337–344.
15. Grandjean P. Paracelsus revisited: the dose concept in a complex world. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; **119**: 126–132.

16. Tsatsakis AM, Vassilopoulou L, Kovatsi L, et al. The dose response principle from philosophy to modern toxicology: The impact of ancient philosophy and medicine in modern toxicology science. *Toxicol Rep* 2018; **5**: 1107–1113.
17. Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond* 2004; **58**: 187–201.
18. Opal SM. A brief history of microbiology and immunology. In: Artenstein AW (ed) *Vaccines: A Biography*. New York: Springer, pp. 31–56.
19. Conti AA. Historical evolution of the concept of health in Western medicine. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis* 2018; **89**: 352–354.
20. Gaynes RP. *Germ theory: medical pioneers in infectious diseases*. Washington, DC: ASM Press, 2011.
21. Barranco C. The first live attenuated vaccines, <https://www.nature.com/articles/d42859-020-00008-5> (2020).
22. Thorkildson P, Kinney HL, AuCoin DP. Pasteur revisited: an unexpected finding in *Bacillus anthracis* vaccine strains. *Virulence* 2016; **7**: 506–507.
23. Tigertt WD. Anthrax. William Smith Greenfield, M.D., F.R.C.P., Professor Superintendent, The Brown Animal Sanatory Institution (1878–81) Concerning the priority due to him for the production of the first vaccine against anthrax. *J Hyg (London)* 1980; **85**: 415–420.
24. Pearce J. Louis Pasteur and Rabies: a brief note. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; **73**: 82.
25. Behring E, Kitasato S. Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschrift* 1890; **49**: 1113–1114.
26. Kaufmann SHE. Remembering Emil von Behring: from tetanus treatment to antibody cooperation with phagocytes. *mBio* 2017; **8**: e00117-17.
27. Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. *J Infect Dis* 2000; **181**: S156–S167.
28. Behring E. Untersuchungen ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschrift* 1890; **50**: 1145–1148.
29. Oedingen C, Staerk JW. First cure for diphtheria by antitoxin as early as 1891. *Ann Sci* 1997; **54**: 607–610.
30. All Nobel Prizes in physiology or medicine, <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-laureates-in-physiology-or-medicine/> (2023, accessed 9 March 2023).
31. Passalacqua G, Canonica GW. Allergen immunotherapy: history and future developments. *Immunol Allergy Clin North Am* 2016; **36**: 1–12.
32. Ehrlich P. Chemotherapie von Infektionskrankheiten. *Z Arztl Fortbild (Jena)* 1909; **6**: 721–733.
33. Schwartz RS. Paul Ehrlich's magic bullets. *New Engl J Med* 2004; **350**: 1079–1080.
34. Ehrlich P. Experimentelle Untersuchungen ubre Immunitat. II. Ueber Abrin. *Dtsch Med Wochenschr* 1891; **17**: 1218–1219.
35. Nesargikar P, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2012; **2**: 103–111.
36. Silverstein AM. *A history of immunology*. 2nd ed. London: Academic Press, 2009.
37. Martin CJ. The curative value of Calmette's antivenomous serum in the treatment of inoculations with the poisons of Australian snake. *Brit Med J* 1898; **2**: 1805–1807.
38. Lira-da-Silva RM, Lourenço M, Bochner R, et al. A contribuição de Vital Brazil para a medicina tropical: dos envenenamentos à especificidade da soroterapia. *An Inst Hig Med Trop (Lisb)* 2016; **15**: 27–32.

39. Pucca MB, Cerni FA, Janke R, et al. History of envenoming therapy and current perspectives. *Front Immunol* 2019; **10**: 1598.
40. Kienle GS. Fever in cancer treatment: Coley's therapy and epidemiologic observations. *Glob Adv Health Med* 2012; **1**: 92–100.
41. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006; **26**: 154–158.
42. Harrington DF. Perhaps one day Coley's Toxins will be celebrated. *The Providence Journal*, 2014, <https://www.providencejournal.com/story/news/2014/12/02/20141202-daniel-f-harrington-perhaps-one-day-coleys-toxins-will-be-celebrated-ece/35441557007/> (2014).
43. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; **5**: 273–290.
44. Freeman J. Leonard Noon. *Int Arch Allergy Immunol* 1953; **4**: 282–284.
45. Freeman J. 'Rush' inoculation, with special reference to hay-fever treatment. *Lancet* 1930; **215**: 744–747.
46. Metchnikoff E. Untersuchungen über die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbeltiere. *Biol Zent Bl* 1883; **3**: 560–565.
47. Cavillon J-M. Inflammation through the ages: a historical perspective. In: *Inflammation*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–15.
48. Gordon S. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 3257–3264.
49. Fagraeus A. Antibody production in relation to the development of plasma cells. In vivo and in vitro experiments. *Acta Med Scand* 1948; **130**: 122–145.
50. Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 489–495.
51. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; **137**: 1142–1162.
52. Cosimi AB. Nobel prizes in medicine in the field of transplantation. *Transplantation* 2006; **82**: 1558–1562.
53. Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked Immune response genes. *Science (1979)* 1972; **175**: 273–279.
54. Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 1975; **256**: 50–52.
55. Neuberger MS. Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol* 2008; **86**: 124–132.
56. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**: 575–581.
57. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; **256**: 495–497.
58. Kulwal V, Sawarkar S. Immunotherapy: a concept. In: Sawarkar SP, Nikam VS, Syed S (eds) *Immunotherapy – A novel facet of modern therapeutics*. Cingapura: Springer, 2021, pp. 1–19.
59. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nature Rev Immunol* 2015; **15**: 185–189.
60. Cantor H, Boyse EA. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med* 1975; **141**: 1376–1389.
61. Dennert G. Evidence for non-identity of T killer and T helper cells sensitised to allogeneic cell antigens. *Nature* 1974; **249**: 358–360.

62. Kisielow P, Hirst JA, Shiku H, et al. Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature* 1975; **253**: 219–220.
63. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**: 2348–2357.
64. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 145–173.
65. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; **89**: 587–596.
66. Lee HJ, Takemoto N, Kurata H, et al. Gata-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* 2000; **192**: 105–116.
67. Burnet FM, Fenner F. *The production of antibodies*. 2nd ed. Melbourne: Macmillan Press, 1949.
68. Mazgaeen L, Gurung P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 379.
69. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 991–1045.
70. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science (1979)* 2002; **296**: 301–305.
71. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 2015; **33**: 257–290.
72. Wicherska-Pawłowska K, Wróbel T, Rybka J. Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs) in innate immunity. TLRs, NLRs, and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 13397.
73. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 10th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2021.
74. Neish AS. Preimmune recognition and response to microbial metabolites. *Physiology* 2021; **36**: 94–101.
75. Behzadi P, García-Perdomo HA, Karpiński TM. Toll-like receptors: general molecular and structural biology. *J Immunol Res* 2021; **2021**: 1–21.
76. Gong T, Liu L, Jiang W, et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 95–112.
77. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021; **6**: 291.
78. Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of the immune system. In: Paul WE (ed) *Fundamental immunology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp. 67–128.
79. Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; **51**: 267–288.
80. Murray PJ. Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol* 2017; **79**: 541–566.
81. Orekhov AN, Orekhova VA, Nikiforov NG, et al. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*; **3**. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.20517/2574-1209.2019.04.
82. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* 2013; **14**: 821–830.
83. Cabeza-Cabrerizo M, Cardoso A, Minutti CM, et al. Dendritic cells revisited. *Annu Rev Immunol* 2021; **39**: 131–166.

84. Feng M, Zhou S, Yu Y, et al. Regulation of the migration of distinct dendritic cell subsets. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 635221.
85. Liu K, Nussenzweig MC. Dendritic cells. In: Paul WE (ed) *Fundamental immunology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp. 381–394.
86. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nature Rev Immunol* 2019; **19**: 89–103.
87. Liu J, Zhang X, Cheng Y, et al. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. *Cell Mol Immunol* 2021; **18**: 2461–2471.
88. Krishnaswamy JK, Alsén S, Yrlid U, et al. Determination of T follicular helper cell fate by dendritic cells. *Front Immunol* 2018; **9**: 2169.
89. Kashem SW, Haniffa M, Kaplan DH. Antigen-presenting cells in the skin. *Annu Rev Immunol* 2017; **35**: 469–499.
90. Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function. *Immunity* 2019; **50**: 37–50.
91. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: what do they all do? *Annu Rev Virol* 2019; **6**: 567–584.
92. Brewitz A, Eickhoff S, Dähling S, et al. CD8⁺ T cells orchestrate pDC-XCR1⁺ dendritic cell spatial and functional cooperativity to optimize priming. *Immunity* 2017; **46**: 205–219.
93. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res* 2017; **27**: 74–95.
94. Tuzlak S, Dejean AS, Iannacone M, et al. Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. *Nature Immunol* 2021; **22**: 1210–1217.
95. Zhu J. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; **10**: a030338.
96. O’Shea JJ. Helper T-cell differentiation and plasticity. In: Paul WE (ed) *Fundamental immunology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp. 708–717.
97. Shevyrev D, Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis. *Front Immunol* 2020; **10**: 3100.
98. Møller SH, Wang L, Ho P-C. Metabolic programming in dendritic cells tailors immune responses and homeostasis. *Cell Mol Immunol* 2022; **19**: 370–383.
99. Romo-Tena J, Gómez-Martín D, Alcocer-Varela J. CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmun Rev* 2013; **12**: 1171–1176.
100. Patsoukis N, Wang Q, Strauss L, et al. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci Adv* 2020; **6**: eabd2712.
101. Sharma N, Vacher J, Allison JP. TLR1/2 ligand enhances antitumor efficacy of CTLA-4 blockade by increasing intratumoral Treg depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**: 10453–10462.
102. Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003; **79**: 672–80.
103. Pearl R. On the pathological relations between cancer and tuberculosis. *Exp Biol Med* 1928; **26**: 73–75.
104. Old LJ, Clark DA, Benacerraf B. Effect of Bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 1959; **184**: 291–292.
105. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; **116**: 180–182.
106. Lenis AT, Lec PM, Chamie K, et al. Bladder cancer: a review. *JAMA* 2020; **324**: 1980.

107. Huang X, Pan J, Xu F, et al. Bacteria-based cancer immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)* 2021; **8**: 2003572.
108. Łukasiewicz K, Fol M. Microorganisms in the treatment of cancer: advantages and limitations. *J Immunol Res* 2018; **2018**: 1–8.
109. How CW, Ong YS, Low SS, et al. How far have we explored fungi to fight cancer? *Semin Cancer Biol* 2022; **86**: 976–989.
110. Bradner WT, Clarke DA, Stock CC. Stimulation of host defense against experimental cancer. I. Zymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Res* 1958; **18**: 347–51.
111. Brown GD, Gordon S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003; **19**: 311–315.
112. Maizels RM. Regulation of immunity and allergy by helminth parasites. *Allergy* 2020; **75**: 524–534.
113. Jo E-K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr Opin Infect Dis* 2008; **21**: 279–286.
114. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 2019; **43**: 187.
115. Fore F, Indriputri C, Mamutse J, et al. TLR10 and Its unique anti-inflammatory properties and potential use as a target in therapeutics. *Immune Netw* 2020; **20**: e21.
116. Farhat K, Riekenberg S, Heine H, et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 692–701.
117. Li M, Yu Y. Innate immune receptor clustering and its role in immune regulation. *J Cell Sci*; **134**. Epub ahead of print 15 February 2021. DOI: 10.1242/jcs.249318.
118. Bournazos S, Wang TT, Dahan R, et al. Signaling by antibodies: recent progress. *Annu Rev Immunol* 2017; **35**: 285–311.
119. Li W, Yan J, Yu Y. Geometrical reorganization of Dectin-1 and TLR2 on single phagosomes alters their synergistic immune signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**: 25106–25114.
120. van der Zande HJP, Nitsche D, Schlautmann L, et al. The mannose receptor: from endocytic receptor and biomarker to regulator of (meta)Inflammation. *Front Immunol*; **12**. Epub ahead of print 14 October 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.765034.
121. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 375–388.
122. Ochando J, Mulder WJM, Madsen JC, et al. Trained immunity - basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev Nephrol* 2023; **19**: 23–37.
123. Wout JW, Poell R, Furth R. The role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice. *Scand J Immunol* 1992; **36**: 713–720.
124. Tribouley J, Tribouley-Duret J, Appriou M. Influence du bacille de Calmette et Guérin (BCG) sur la réceptivité de la Souris nude vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. *C R Seances Soc Biol Fil* 1978; **172**: 902–4.
125. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, et al. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell* 2018; **172**: 176–190.e19.
126. Goodridge HS, Ahmed SS, Curtis N, et al. Harnessing the beneficial heterologous effects of vaccination. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**: 392–400.
127. Cardillo F, Bonfim M, da Silva Vasconcelos Sousa P, et al. Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for cancer. *Vaccines (Basel)* 2021; **9**: 439.
128. de Laval B, Maurizio J, Kandalla PK, et al. C/EBP β -dependent epigenetic memory induces trained immunity in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2020; **26**: 657–674.e8.

129. Toussi D, Massari P. Immune adjuvant effect of molecularly-defined Toll-like receptor ligands. *Vaccines (Basel)* 2014; **2**: 323–353.
130. Nazeam JA, Singab ANB. Immunostimulant plant proteins: potential candidates as vaccine adjuvants. *Phytotherapy Research* 2022; **36**: 4345–4360.
131. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res* 2020; **30**: 660–669.
132. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (1979)* 2018; **359**: 1350–1355.
133. He M, Chai Y, Qi J, et al. Remarkably similar CTLA-4 binding properties of therapeutic ipilimumab and tremelimumab antibodies. *Oncotarget* 2017; **8**: 67129–67139.
134. Roberts MB, Fishman JA. Immunosuppressive agents and infectious risk in transplantation: managing the ‘Net State of Immunosuppression’. *Clin Infect Dis* 2021; **73**: e1302–e1317.
135. Kaneko Y, Takeuchi T. Targeted antibody therapy and relevant novel biomarkers for precision medicine for rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 2017; **29**: 511–517.
136. Vitiello G, Emmi G, Silvestri E, et al. Intravenous immunoglobulin therapy: a snapshot for the internist. *Intern Emerg Med* 2019; **14**: 1041–1049.
137. Arumugham VB, Rayi A. *Intravenous Immunoglobulin (IVIG)*. 2023.
138. Imbach P, d’Apuzzo V, Hirt A, et al. High-dose intravenous gamma-globulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1981; **317**: 1228–1231.
139. Akatsuka M, Masuda Y, Tatsumi H, et al. Efficacy of intravenous immunoglobulin therapy for patients with sepsis and low immunoglobulin G levels: a single-center retrospective study. *Clin Ther* 2022; **44**: 295–303.
140. Wilfong EM, Matthay MA. Intravenous immunoglobulin therapy for COVID-19 ARDS. *Lancet Resp Med* 2022; **10**: 123–125.
141. Wallis RS, O’Garra A, Sher A, et al. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future. *Nat Rev Immunol* 2023; **23**: 121–133.
142. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Brit J Cancer* 2019; **120**: 6–15.
143. Slifka MK, Amanna IJ. Passive immunization. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, et al. (eds) *Plotkin’s Vaccines*. Filadélfia: Elsevier, 2018, pp. 84–95.
144. Mishra AK, Ali A, Dutta S, et al. Emerging trends in immunotherapy for cancer. *Diseases*; **10**. Epub ahead of print 6 September 2022. DOI: 10.3390/diseases10030060.
145. Jewett A, Tseng H-C. Immunotherapy. In: Dowd FJ, Mariotti AJ, Johnson BS (eds) *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. St. Louis: Elsevier, 2017, pp. 504–529.
146. Herzig V. Animal venoms—curse or cure? *Biomedicines* 2021; **9**: 413.
147. Durham SR, Shamji MH. Allergen immunotherapy: past, present and future. *Nat Rev Immunol* 2022; 1–12.
148. Trabolsi A, Arumov A, Schatz JH. T cell-activating bispecific antibodies in cancer therapy. *J Immunol* 2019; **203**: 585–592.
149. Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, et al. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer* 2014; **2**: 14.
150. Michaud H-A, Eliaou J-F, Lafont V, et al. Tumor antigen-targeting monoclonal antibody-based immunotherapy: Orchestrating combined strategies for the development of long-term antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2014; **3**: e955684.
151. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **149**: 960–968.
152. Mehrabadi AZ, Ranjbar R, Farzanehpour M, et al. Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review. *Biomed Pharmacother* 2022; **146**: 112512.

153. Zhang C, Liu J, Zhong JF, et al. Engineering CAR-T cells. *Biomarker Res* 2017; **5**: 22.
154. Mohammadi M, Akhoundi M, Malih S, et al. Therapeutic roles of CAR T cells in infectious diseases: Clinical lessons learnt from cancer. *Rev Med Virol*; **32**. Epub ahead of print 17 July 2022. DOI: 10.1002/rmv.2325.
155. Sengsayadeth S, Savani BN, Oluwole O, et al. Overview of approved CAR-T therapies, ongoing clinical trials, and its impact on clinical practice. *EJHaem* 2022; **3**: 6–10.
156. Kumaresan PR, Manuri PR, Albert ND, et al. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 10660–10665.
157. Tian Y, Hu D, Li Y, et al. Development of therapeutic vaccines for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine* 2022; **3**: 40.
158. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2021; **21**: 83–100.
159. Pastor Y, Ghazzoui N, Hammoudi A, et al. Refining the DC-targeting vaccination for preventing emerging infectious diseases. *Front Immunol*; **13**. Epub ahead of print 9 August 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.949779.
160. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007; **37**: S53–S60.
161. Rajak KK. Immunotherapy for cancer treatment. In: Jain BP (ed) *Understanding Cancer*. Londres: Elsevier, 2022, pp. 269–286.
162. Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, et al. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 790–802.
163. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; **363**: 411–422.
164. Huggins JL, Looney RJ. Allergen immunotherapy. *Am Fam Physician* 2004; **70**: 689–96.
165. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, et al. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 2021; **21**: 360–378.
166. Tie Y, Tang F, Wei Y, et al. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol* 2022; **15**: 61.
167. Rethinking therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: 685–686.
168. Deepe Jr GS. Preventative and therapeutic vaccines for fungal infections: from concept to implementation. *Expert Rev Vaccines* 2004; **3**: 701–709.
169. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, et al. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1971; **1**: 242–248.
170. Sela M, Teitelbaum D. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2001; **2**: 1149–1165.
171. Aharoni R. Immunomodulatory peptidomimetics for multiple sclerosis therapy—the story of glatiramer acetate (Copaxone). In: Qvit N, Rubin SJS (eds) *Peptide and Peptidomimetic Therapeutics*. Londres: Elsevier, 2022, pp. 507–520.
172. Oliveira LVN, Wang R, Specht CA, et al. Vaccines for human fungal diseases: close but still a long way to go. *NPJ Vaccines* 2021; **6**: 33.
173. Franco M, Montenegro MR. Pathology. In: Franco M, Lacaz C da S, Restrepo-Moreno A, et al. (eds) *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 2018, pp. 131–150.
174. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses americanas. *O Brasil Médico* 1908; **22**: 21–24.
175. Splendore A. Splendore A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della boca, osservata in Brasile. *Bull Soc Pathol Exot* 1912; **5**: 313–319.

176. Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidicos nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. *An Fac Med Univ São Paulo* 1930; **5**: 125–141.
177. Lacaz CS. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, et al. (eds) *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 2018, pp. 1–12.
178. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 2006; **23**: 65–73.
179. Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 2008; **45**: 605–612.
180. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 2009; **52**: 273–283.
181. Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo Á, et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics* 2010; **26**: 613–624.
182. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol* 2017; **106**: 9–25.
183. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**: 89–117.
184. Rodrigues AM, Hagen F, Puccia R, et al. *Paracoccidioides* and paracoccidioidomycosis in the 21st Century. *Mycopathologia*. Epub ahead of print 12 January 2023. DOI: 10.1007/s11046-022-00704-y.
185. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; **57 Suppl 19**: 11–20.
186. Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J Fungi (Basel)* 2017; **3**: 1.
187. Prado M, Silva MB da, Laurenti R, et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; **104**: 513–21.
188. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 2002; **10**: 80–87.
189. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; **20**: 129–132.
190. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984; **46**: 346–353.
191. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 1988; **56**: 711–713.
192. Shankar J, Wu TD, Clemons K V, et al. Influence of 17beta-estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. *PLoS One* 2011; **6**: e28402.
193. San-Blas G, San-Blas F, Rodríguez LE, et al. Un modelo de dimorfismo en hongos patógenos: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez* 1987; **38**: 202–11.
194. Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, et al. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1969; **97**: 1036–1041.

195. Carbonell LM, Kanetsuna F, Gil F. Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1970; **101**: 636–642.
196. Guimarães de Matos G, Barroso de Figueiredo AM, Diniz Gonçalves PH, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* induces IL-32 and is controlled by IL-15/IL-32/vitamin D pathway in vitro. *Microb Pathog* 2021; **154**: 104864.
197. Hogan LH, Klein BS. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun* 1994; **62**: 3543–3546.
198. Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 1366–1370.
199. de Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, et al. *Paracoccidioides*-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol*; **6**. Epub ahead of print 25 November 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01319.
200. Chaves EGA, Parente-Rocha JA, Baeza LC, et al. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during infection of alveolar macrophages primed or not by interferon-gamma. *Front Microbiol*; **10**. Epub ahead of print 5 February 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00096.
201. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun* 1989; **57**: 2289–2294.
202. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, et al. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* 1988; **140**: 2786–9.
203. Mendes-Giannini MJS, Monteiro da Silva JL, de Fátima da Silva J, et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia* 2008; **165**: 237–248.
204. Parente-Rocha JA, Parente AFA, Baeza LC, et al. Macrophage interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. *PLoS One* 2015; **10**: e0137619.
205. Kashino SS, Fazioli R dos A, Moscardi-Bacchi M, et al. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 1995; **130**: 131–40.
206. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 2000; **68**: 2546–2552.
207. Moreira AP, Cavassani KA, Tristão FSM, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol* 2008; **180**: 3049–3056.
208. Nishikaku AS, Molina RFS, Ribeiro LC, et al. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 2009; **198**: 123–135.
209. Neworal E. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2003; **21**: 234–241.
210. Pina A, Bernardino S, Calich VLG. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 1088–1099.
211. Gonzalez A, Hernandez O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. *Yeast* 2016; **33**: 113–128.

212. Bedoya V, McEwen JG, Tabares AM, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a histopathological study of the experimental murine infection. *Mycopathologia* 1986; **94**: 133–144.
213. Pina A, Saldiva PHN, Restrepo LEC, et al. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 1202–1213.
214. Xidieh CF, Lenzi HL, Calich VLG, et al. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Microbiol Immunol* 1999; **188**: 41–49.
215. Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, et al. Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* 2016; **11**: e0163985.
216. Burger E. Paracoccidioidomycosis protective immunity. *J Fungi (Basel)*; 7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3390/jof7020137.
217. Peraçoli MTS, Soares AMVC, Mendes RP, et al. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 1991; **29**: 373–380.
218. Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect Immun* 1984; **46**: 552–558.
219. Longhi LNA, da Silva RM, Fornazim MC, et al. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Immunol* 2012; **189**: 935–945.
220. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, et al. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and Toll-like receptor–2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis* 2007; **196**: 1108–1115.
221. Pina A, Frank de Araujo E, Felonato M, et al. Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells. *Infect Immun* 2013; **81**: 1064–1077.
222. Peron G, Oliveira J, Fernandes FF, et al. Lung CD103(+) dendritic cells of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* contribute to Treg differentiation. *Microb Pathog* 2021; **150**: 104696.
223. Brown GD. Innate anti-fungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 1–21.
224. Loures F V, Pina A, Felonato M, et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Infect Immun* 2011; **79**: 2470–2480.
225. Loures F V., Pina A, Felonato M, et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun* 2010; **78**: 1078–1088.
226. Jannuzzi GP, de Almeida JRF, Amarante-Mendes GP, et al. TLR3 Is a negative regulator of immune responses against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; **8**: 426.
227. Morais EA, Chame DF, Melo EM, et al. TLR 9 involvement in early protection induced by immunization with rPb27 against paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2016; **18**: 137–147.
228. Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, et al. Role of TLR2 and TLR4 in Human Neutrophil Functions Against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol* 2010; **71**: 99–108.

229. Bonfim CV, Mamoni RL, Lima Blotta MHS. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 2009; **47**: 722–733.
230. Menino JF, Saraiva M, Gomes-Alves AG, et al. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**: e2317.
231. Vieira IR, Fernandes RK, Rodrigues DR, et al. TLR9 stimulation induces increase in fungicidal activity of human dendritic cells challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 2018; **56**: 911–915.
232. Loures F V., Pina A, Felonato M, et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol* 2009; **183**: 1279–1290.
233. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol* 2015; **194**: 4507–4517.
234. Feriotti C, de Araujo EF, Loures F V, et al. NOD-like receptor P3 inflammasome controls protective Th1/Th17 immunity against pulmonary paracoccidioidomycosis. *Front Immunol* 2017; **8**: 786.
235. Tavares AH, Magalhaes KG, Almeida RD, et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**: e2595.
236. Souza COS, Ketelut-Carneiro N, Milanezi CM, et al. NLRC4 inhibits NLRP3 inflammasome and abrogates effective antifungal CD8+ T cell responses. *iScience* 2021; **24**: 102548.
237. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 2015; **16**: 343–353.
238. Silvana dos Santos S, Ferreira KS, Almeida SR. *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. *PLoS One* 2011; **6**: e19690.
239. Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, et al. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; **24**: 269–283.
240. Espinosa V, Rivera A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine* 2012; **58**: 100–106.
241. Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998; **31**: 615–23.
242. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1811–20.
243. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol* 2007; **45**: 27–33.
244. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine* 2005; **32**: 20–29.
245. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol* 1994; **40**: 159–164.
246. de Arruda Grossklauss D, Bailao AM, Vieira Rezende TC, et al. Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes Infect* 2013; **15**: 347–364.

247. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect* 2013; **67**: 470–485.
248. Chequer-Bou-Habib D, Daniel-Ribeiro C, Banic DM, et al. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1989; **108**: 89–93.
249. Marcelino França K, Verícimo MA, Retamal C, et al. B1 cells contribution to susceptibility in experimental paracoccidioidomycosis: immunoglobulin isotypes and repertoire determination. *Med Mycol* 2006; **44**: 755–766.
250. Rodriguez-Zhurbenko N, Quach TD, Hopkins TJ, et al. Human B-1 cells and B-1 cell antibodies change with advancing age. *Front Immunol*; **10**. Epub ahead of print 19 March 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00483.
251. Tristão FS, Panagio LA, Rocha FA, et al. B cell-deficient mice display enhanced susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Mycopathologia* 2013; **176**: 1–10.
252. Fortes MR, Miot HA, Kurokawa CS, et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol* 2011; **86**: 516–524.
253. Benard G. Pathogenesis and Classification of Paracoccidioidomycosis: New Insights From Old Good Stuff. *Open Forum Infect Dis* 2021; **8**: ofaa624.
254. Pina A, Valente-Ferreira RC, Molinari-Madlum EEW, et al. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect Immun* 2004; **72**: 2369–2378.
255. Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, et al. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun* 2004; **72**: 3932–3940.
256. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 2002; **4**: 139–144.
257. Mamoni R, Blotta M. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2006; **35**: 207–216.
258. Calich VLG, Mamoni RL, Loures F V. Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. *Virulence* 2019; **10**: 810–821.
259. Paroli M, Caccavale R, Fiorillo MT, et al. The double game played by Th17 cells in infection: host defense and immunopathology. *Pathogens* 2022; **11**: 1547.
260. Peron G, Oliveira J, Thomaz L de L, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection increases regulatory T cell counts in female C57BL/6 mice infected via two distinct routes. *Immunobiology* 2020; **225**: 151963.
261. Loures F V, Araujo EF, Feriotti C, et al. TLR-4 cooperates with dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Front Microbiol* 2015; **6**: 261.
262. Loures F V, Araujo EF, Feriotti C, et al. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+ IL-17+ cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis* 2014; **210**: 762–773.
263. Tristao FSM, Rocha FA, Carlos D, et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. *Front Immunol* 2017; **8**: 949.
264. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, et al. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog* 2011; **50**: 263–267.
265. Puerta-Arias JD, Mejía SP, González Á. The role of the interleukin-17 axis and neutrophils in the pathogenesis of endemic and systemic mycoses. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; **10**: 595301.

266. Galdino NAL, Loures F V, de Araujo EF, et al. Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome. *Sci Rep* 2018; **8**: 16544.
267. Calich VLG, Pina A, Felonato M, et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; **53**: 1–7.
268. Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol* 1985; **66**: 585–94.
269. Marakalala MJ, Kerrigan AM, Brown GD. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. *Mammalian Genome* 2011; **22**: 55–65.
270. Kalia N, Singh J, Kaur M. The role of dectin-1 in health and disease. *Immunobiology* 2021; **226**: 152071.
271. Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev* 2010; **234**: 335–352.
272. Romagnolo AG, de Quaglia ESJC, Della Coletta AM, et al. Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses* 2018; **61**: 222–230.
273. van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, et al. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11**: 305–312.
274. Klaessens S, Stroobant V, De Plaen E, et al. Systemic tryptophan homeostasis. *Front Mol Biosci*; **9**. Epub ahead of print 14 September 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.897929.
275. Munn DH, Sharma MD, Baban B, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 2005; **22**: 633–642.
276. Baban B, Chandler PR, Sharma MD, et al. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J Immunol* 2009; **183**: 2475–2483.
277. de Araujo EF, Loures F V, Feriotti C, et al. Disease tolerance mediated by phosphorylated indoleamine-2,3 dioxygenase confers resistance to a primary fungal pathogen. *Front Immunol* 2017; **8**: 1522.
278. Araujo EF, Loures F V, Bazan SB, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls fungal loads and immunity in Paracoccidioidomycosis but is more important to susceptible than resistant hosts. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e3330.
279. de Araujo EF, Feriotti C, Galdino NAL, et al. The IDO-AhR axis controls Th17/Treg immunity in a pulmonary model of fungal infection. *Front Immunol* 2017; **8**: 880.
280. Araujo EF, Medeiros DH, Galdino NA, et al. Tolerogenic plasmacytoid dendritic cells control *Paracoccidioides brasiliensis* infection by inducing regulatory T cells in an IDO-dependent manner. *PLoS Pathog* 2016; **12**: e1006115.
281. Song X, Si Q, Qi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1: a promising therapeutic target in malignant tumor. *Front Immunol*; **12**. Epub ahead of print 23 December 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.800630.
282. Preite NW, Kaminski V de L, Borges BM, et al. Myeloid-derived suppressor cells are associated with impaired Th1 and Th17 responses and severe pulmonary paracoccidioidomycosis which is reversed by anti-Gr1 therapy. *Front Immunol*; **14**. Epub ahead of print 26 January 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1039244.
283. Ribeiro DO. Nova terapêutica para a blastomicose. *Publ méd (SPaulo)* 1940; **12**: 36–54.

284. Pedrosa PN, Wanke B, Coura JR. Emprego da associação sulfametoxazol + trimetoprim no tratamento da paracoccidiodose (blastomicose Sul-Americana). *Rev Soc Bras Med Trop* 1974; **8**: 159–165.
285. Hahn RC, Hagen F, Mendes RP, et al. Paracoccidiodomycosis: current status and future trends. *Clin Microbiol Rev*; **35**. Epub ahead of print 21 December 2022. DOI: 10.1128/cmr.00233-21.
286. Lacaz CS, Sampaio SA. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares. *Rev Paul Med* 1958; **52**: 443–450.
287. Dutcher JD, Gold W, Pagano JF, et al. *Amphotericin B, its production, and its salts*. 2,908,612, United States of America: United States Patent Office, 1959.
288. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 1–10.
289. Woolley DW. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J Bioll Chem* 1944; **152**: 225–232.
290. Fromtling RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev* 1988; **1**: 187–217.
291. Rezkallah-Iwasso MT, Mota NGS, Gomes MCG, et al. Effect of levamisole on experimental paracoccidiodomycosis in the Syrian hamster: Immunologic and histopathologic correlation. *Mycopathologia* 1984; **84**: 171–180.
292. Peraçoli MTS, Rezkallah-Iwasso MT, Mota NGS, et al. Dialysable leukocyte extracts modify the course of experimental paracoccidiodomycosis in the Syrian hamster. *Mycopathologia* 1993; **121**: 149–156.
293. Peraçoli MT, Montenegro MR, Soares AM, et al. Transfer of cell-mediated immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* in hamsters with dialysable leukocyte extracts. *J Med Vet Mycol* 1990; **28**: 35–46.
294. Arnaudov A. Immunotherapy with dialyzable leukocyte extracts containing transfer factor. In: Metodiev K (ed) *Immunotherapy - myths, reality, ideas, future*. InTech, 2017, pp. 325–344.
295. Lionakis MS, Drummond RA, Hohl TM. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. *Nat Rev Immunol*. Epub ahead of print 4 January 2023. DOI: 10.1038/s41577-022-00826-w.
296. Meira DA, Pereira PC, Marcondes-Machado J, et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidiodomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **55**: 496–503.
297. Santos LA, Grisolia JC, Burger E, et al. Virulence factors of *Paracoccidioides brasiliensis* as therapeutic targets: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2020; **113**: 593–604.
298. Sharon N, Lis H. Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science (1979)* 1989; **246**: 227–234.
299. Peumans WJ, Van Damme EJM. The role of lectins in plant defence. *Histochem J* 1995; **27**: 253–271.
300. Pereira-da-Silva G, Roque-Barreira MC, Van Damme EJM. Artin M: A rational substitution for the names artocarpin and KM+. *Immunol Lett* 2008; **119**: 114–115.
301. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol* 1994; **153**: 1798–807.
302. Ganiko L, Martins AR, Espreafico EM, et al. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconj J* 1998; **15**: 531–534.
303. Ganiko L, Martins AR, Freymüller E, et al. Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2005; **1721**: 152–163.
304. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, et al. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; **132**: 221–230.

305. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a Toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol* 2008; **173**: 423–32.
306. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira M-C, et al. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 2001; **11**: 1035–1042.
307. Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 2006; **24**: 3001–3008.
308. Coltri KC, Oliveira LL, Ruas LP, et al. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Med Mycol* 2010; **48**: 792–799.
309. Freitas MS, Oliveira AF, da Silva TA, et al. Paracoccin induces M1 polarization of macrophages via interaction with TLR4. *Front Microbiol* 2016; **7**: 1003.
310. da Silva TA, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. Data on IL-17 production induced by plant lectins. *Data Brief* 2016; **7**: 1584–1587.
311. da Silva TA, Mariano VS, Sardinha-Silva A, et al. IL-17 Induction by ArtinM is due to stimulation of IL-23 and IL-1 α Release and/or interaction with CD3 in CD4+ T cells. *PLoS One* 2016; **11**: e0149721.
312. de Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CRB, et al. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Neglect Trop Dis* 2008; **2**: e183.
313. Shibaki A, Katz SI. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 2002; **11**: 126–134.
314. Oscherwitz J, Hankenson FC, Yu F, et al. Low-dose intraperitoneal Freund's adjuvant: toxicity and immunogenicity in mice using an immunogen targeting amyloid- β peptide. *Vaccine* 2006; **24**: 3018–3025.
315. Stils HF. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* 2005; **46**: 280–293.
316. Magro JTJ. *Ineficácia de BCG como agente terapêutico no curso da paracoccidioidomicose experimental*. Trabalho de Conclusão de Curso, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP, 2010.
317. Landgraf TN. *Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de Paracoccidioides brasiliensis têm efeito terapêutico na paracoccidioidomicose experimental*. Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 2016.
318. Landgraf TN, Fernandes FF, Peron G, et al. Therapeutic effect of monophosphoryl lipid A administration on *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. *Med Mycol* 2017; **55**: 344–348.
319. Coltri KC, Casabona-Fortunato AS, Gennari-Cardoso ML, et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. *Microbes Infect* 2006; **8**: 704–13.
320. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MTS, et al. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia* 2008; **166**: 17–23.
321. Ganiko L, Puccia R, Mariano VS, et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes Infect* 2007; **9**: 695–703.
322. dos Reis Almeida FB, de Oliveira LL, de Sousa MV, et al. Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis* purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. *Yeast* 2010; **27**: 67–76.

323. Dos Reis Almeida FB, Carvalho FC, Mariano VS, et al. Influence of N-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *PLoS One* 2011; **6**: e29216.
324. Alegre AC, Oliveira AF, Dos Reis Almeida FB, et al. Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e2788.
325. Alegre-Maller AC, Mendonca FC, da Silva TA, et al. Therapeutic administration of recombinant paracoccin confers protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection: involvement of TLRs. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e3317.
326. Fernandes FF, Oliveira AF, Landgraf TN, et al. Impact of paracoccin gene silencing on *Paracoccidioides brasiliensis* virulence. *mBio*; **8**. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1128/mBio.00537-17.
327. Gonçalves RA, Ricci-Azevedo R, Vieira VCS, et al. Paracoccin overexpression in *Paracoccidioides brasiliensis* enhances fungal virulence by remodeling chitin properties of the cell wall. *J Infect Dis* 2021; **224**: 164–174.
328. Pitangui N de S, Fernandes FF, Gonçalves RA, et al. Virulence Vs. immunomodulation: roles of the paracoccin chitinase and carbohydrate-binding sites in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Front Mol Biosci* 2021; **8**: 700797.
329. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1004397.
330. Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, et al. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res* 1994; **27**: 2309–13.
331. Puccia R, Taborda CP. The story of *Paracoccidioides* gp43. *Brazilian Journal of Microbiology*. Epub ahead of print 13 April 2023. DOI: 10.1007/s42770-023-00962-y.
332. Vicentini AP, Gesztesí JL, Franco MF, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 1994; **62**: 1465–1469.
333. Gesztesí J-L, Puccia R, Travassos LR, et al. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma* 1996; **15**: 415–422.
334. Almeida SR, Unterkircher CS, Camargo ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med Mycol* 1998; **36**: 405–11.
335. Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* 2002; **218**: 87–94.
336. de Almeida SR, de Moraes JZ, de Camargo ZP, et al. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 1998; **190**: 68–76.
337. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett* 2004; **94**: 107–114.
338. Ferreira K, Almeida S. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Immunol Lett* 2006; **103**: 121–126.
339. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis* 1997; **175**: 1263–7.

340. Benard G, Romano CC, Cacere CR, et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001; **13**: 248–252.
341. Sato PK, Oshiro TM, Passos EC, et al. Monocyte-Derived Dendritic Cells Can Revert In Vitro Antigen-Specific Cellular Anergy in Active Human Paracoccidioidomycosis. *J Fungi (Basel)*; 7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3390/jof7030201.
342. Travassos LR, Taborda CP, Iwai LK, et al. The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate. In: *Human Fungal Pathogens*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004, pp. 279–296.
343. Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, et al. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 1998; **66**: 786–793.
344. Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect* 2005; **7**: 55–65.
345. Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, et al. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med* 2003; **9**: 209–219.
346. Taborda CP, Nakaie CR, Cilli EM, et al. Synthesis and immunological activity of a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol* 2004; **59**: 58–65.
347. Marques AF, da Silva MB, Juliano MAP, et al. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2814–2819.
348. Faintuch BL, Oliveira EA, Munoz JE, et al. Radiochemical pharmacokinetic profile of P10 peptide with antifungal properties. *Med Mycol* 2014; **52**: 546–551.
349. Rittner GM, Munoz JE, Marques AF, et al. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; **6**: e1519.
350. Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, et al. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Vaccine Immunol* 2012; **19**: 23–29.
351. Silva LBR, Taira CL, Dias LS, et al. Experimental therapy of paracoccidioidomycosis using P10-primed monocyte-derived dendritic cells isolated from infected mice. *Front Microbiol* 2019; **10**: 1727.
352. Santos Junior SR dos, Kelley Lopes da Silva F, Santos Dias L, et al. Intranasal vaccine using P10 peptide complexed within chitosan polymeric nanoparticles as experimental therapy for paracoccidioidomycosis in murine model. *Journal of Fungi* 2020; **6**: 160.
353. Jannuzzi GP, Tavares AHFP, Kaihama GH, et al. scFv from antibody that mimics gp43 modulates the cellular and humoral immune responses during experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS One* 2015; **10**: e0129401.
354. Ferreira KS, Maranhao AQ, Garcia MC, et al. Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp43 induces protection against experimental Paracoccidioidomycosis. *PLoS One* 2011; **6**: e15935.
355. Jannuzzi GP, Souza N de A, Françoso KS, et al. Therapeutic treatment with scFv–PLGA nanoparticles decreases pulmonary fungal load in a murine model of paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2018; **20**: 48–56.
356. Leitão NPJr, Vallejo MC, Conceicao PM, et al. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e3111.

357. Hahn RC, Rodrigues AM, Della Terra PP, et al. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Neglect Trop Dis* 2019; **13**: e0007437.
358. Messias Rodrigues A, Silveira-Gomes F, de Hoog GS, et al. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon Region: Description of Two Cases. *Am J Trop Med Hyg* 2012; **87**: 710–714.
359. Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FF, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol* 2014; **52**: 19–28.
360. Mattos K, Cocio TA, Chaves EGA, et al. An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: Molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from Mato Grosso do Sul State. *PLoS Neglect Trop Dis* 2021; **15**: e0009317.
361. Theodoro RC, Teixeira Mde M, Felipe MS, et al. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One* 2012; **7**: e37694.
362. Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 1331–1354.
363. Ghosh S. Sialic acid and biology of life: an introduction. In: *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*. Elsevier, 2020, pp. 1–61.
364. Cocio TA, Nascimento E, von Zeska Kress MR, et al. Phylogenetic species of *Paracoccidioides* spp. isolated from clinical and environmental samples in a hyperendemic area of paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil. *J Fungi (Basel)*; **6**. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/jof6030132.
365. Cocio TA, Nascimento E, Kress M, et al. Characterization of a *Paracoccidioides* spp. strain from Southeastern Brazil genotyped as *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3) and review of this phylogenetic species. *Genet Mol Biol* 2020; **43**: e20190201.
366. De Oliveira LL. *Proteínas ligantes de fetuína: caracterização e papel biológico na paracoccidioidomicose experimental*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2006.
367. Fernandes FF, Oliveira LL de, Landgraf TN, et al. Detrimental effect of fungal 60-kDa heat shock protein on experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PloS One ONE* 2016; **11**: e0162486.
368. Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, et al. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a004390.
369. Fałkowska-Podstawka M, Wernicki A. Heat shock proteins in health and disease. *Pol J Vet Sci* 2003; **6**: 61–70.
370. Hernandez O, Garcia AM, Almeida AJ, et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast* 2011; **28**: 771–81.
371. Cleare LG, Zamith-Miranda D, Nosanchuk JD. Heat shock proteins in *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. *Clinical and Vaccine Immunology*; **24**. Epub ahead of print November 2017. DOI: 10.1128/CVI.00221-17.
372. Nicola AM, Andrade R V, Dantas AS, et al. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 158.
373. Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 2001; **39**: 445–455.
374. Peron G, Fernandes FF, Landgraf TN, et al. Recombinant 60-kDa heat shock protein from *Paracoccidioides brasiliensis*: is it a good antigen for serological diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; **50**. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1590/1414-431x20175928.

375. Cunha DA, Zancope-Oliveira RM, Sueli M, et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 374–377.
376. Sherman M, Goldberg AL. Heat shock-induced phosphorylation of GroEL alters its binding and dissociation from unfolded proteins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31479–83.
377. Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 1994; **371**: 578–586.
378. Long KH, Gomez FJ, Morris RE, et al. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *The Journal of Immunology* 2003; **170**: 487–494.
379. Kurokawa CS, Araujo JP, Soares AMVC, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol* 2007; **51**: 421–8.
380. Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis* 2003; **187**: 1496–1505.
381. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; **420**: 885–91.
382. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (cars) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 2008; **29**: 617–625.
383. Soares R de BA, Gomez FJ, de Almeida Soares CM, et al. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infect Immun* 2008; **76**: 4214–4221.
384. Buckwalter MR, Srivastava PK. “It is the antigen(s), stupid” and other lessons from over a decade of vaccitherapy of human cancer. *Semin Immunol* 2008; **20**: 296–300.
385. Thomaz L, Nosanchuk JD, Rossi DC, et al. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 induce a protective immune response against experimental *Paracoccidioides lutzii*. *Microbes Infect* 2014; **16**: 788–795.
386. Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, et al. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine* 2010; **28**: 1528–1534.
387. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; **400**: 269–271.
388. Williams J. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines (Basel)* 2013; **1**: 225–249.
389. Souza IEL, Fernandes FF, Schiavoni MCL, et al. Therapeutic effect of DNA vaccine encoding the 60-kDa-heat shock protein from *Paracoccidioides brasiliensis* on experimental paracoccidioidomycosis in mice. *Vaccine* 2019; **37**: 5607–5613.
390. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683–765.
391. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology* 2008; **180**: 5771–5777.
392. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; **40**: 153–159.
393. Buissa-Filho R, Puccia R, Marques AF, et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. *Infect Immun* 2008; **76**: 3321–3328.
394. de Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun* 2003; **71**: 6534–6542.

395. Xander P, Vigna AF, Feitosa L dos S, et al. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect* 2007; **9**: 1484–1492.
396. Moura ÁND, Oliveira DSL de, Paredes V, et al. *Paracoccidioides* HSP90 can be found in the cell surface and is a target for antibodies with therapeutic potential. *J Fungi (Basel)*; **6**. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/jof6040193.
397. Bueno RA, Thomaz L, Munoz JE, et al. Antibodies against glycolipids enhance antifungal activity of macrophages and reduce fungal burden after infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Front Microbiol* 2016; **7**: 74.
398. Pigosso LL, Parente AF, Coelho AS, et al. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol* 2013; **60**: 87–100.
399. Casaletti L, Lima PS, Oliveira LN, et al. Analysis of *Paracoccidioides lutzii* mitochondria: a proteomic approach. *Yeast* 2017; **34**: 179–188.
400. Tashima AK, Castilho DG, Chaves AF, et al. Data in support of quantitative proteomics to identify potential virulence regulators in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Data Brief* 2015; **5**: 155–160.
401. do Amaral CC, Fernandes GF, Rodrigues AM, et al. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* complex isolates: correlation of the levels of differentially expressed proteins with in vivo virulence. *PLoS One* 2019; **14**: e0218013.
402. Panunto-Castelo A, Freitas-da-Silva G, Bragheto IC, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2003; **5**: 1205–1211.
403. Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JM, et al. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods* 2011; **367**: 78–84.
404. Fernandes VC, Martins EM, Boeloni JN, et al. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2011; **13**: 1062–1072.
405. Ham RG. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965; **53**: 288–293.
406. Landgraf TN, Costa M V, Oliveira AF, et al. Involvement of dihydrolipoyl dehydrogenase in the phagocytosis and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by macrophages. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1803.
407. Corrêa PC, Fernandes FF, Costa M V, et al. Biochemical characterization and analysis of gene expression of an α -mannosidase secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 2022; **60**: myac002.
408. Alberts B, Heald R, Johnson A, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 7th ed. WW Norton & Co., 2022.
409. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, et al. N-glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. (eds) *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/> (2022, accessed 1 May 2023).
410. Cumming DA. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* 1991; **1**: 115–130.
411. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017; **27**: 3–49.
412. Moremen KW. Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2002; **1573**: 225–235.
413. Moremen K, Trimble RB, Herscovics A. Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology* 1994; **4**: 113–125.

414. Gonzalez DS, Jordan IK. The α -mannosidases: phylogeny and adaptive diversification. *Mol Biol Evol* 2000; **17**: 292–300.
415. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 1991; **280**: 309–316.
416. Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 1997; **7**: 637–644.
417. Daniel PF, Winchester B, Warren CD. Mammalian α -mannosidases-multiple forms but a common purpose? *Glycobiology* 1994; **4**: 551–566.
418. Herscovics A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1999; **1473**: 96–107.
419. van den Elsen JMH. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J* 2001; **20**: 3008–3017.
420. Inoue T, Yoshida T, Ichishima E. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 1,2- α -D-mannosidase gene, msdS, from *Aspergillus saitoi* and expression of the gene in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1995; **1253**: 141–145.
421. Keskar SS, Gaikwad SM, Khire JM, et al. Production and properties of α -mannosidase from *Aspergillus* sp. *Biotechnol Lett* 1993; **15**: 685–690.
422. Yamashita K, Ichishima E, Arai M, et al. An α -mannosidase purified from *Aspergillus saitoi* is specific for α 1,2 linkages. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; **96**: 1335–1342.
423. Yoshida T, Inoue T, Ichishima E. 1,2- α -D-mannosidase from *Penicillium citrinum*: molecular and enzymic properties of two isoenzymes. *Biochemical Journal* 1993; **290**: 349–354.
424. Eneyskaya E V., Kulminskaya AA, Savel'ev AN, et al. α -Mannosidase from *Trichoderma reesei* participates in the postsecretory deglycosylation of glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **245**: 43–49.
425. Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, et al. Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N-glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot Cell* 2007; **6**: 2184–93.
426. Zamith-Miranda D, Nimrichter L, Rodrigues ML, et al. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes Infect* 2018; **20**: 501–504.
427. de Toledo Martins S, Szwarc P, Goldenberg S, et al. Extracellular vesicles in fungi: composition and functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 2019; **422**: 45–59.
428. da Silva TA, Roque-Barreira MC, Casadevall A, et al. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep* 2016; **6**: 35867.
429. Peres da Silva R, Heiss C, Black I, et al. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. *Sci Rep* 2015; **5**: 14213.
430. Octaviano CE, Abrantes NE, Puccia R. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* can induce the expression of fungal virulence traits in vitro and enhance infection in mice. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; **12**: 834653.
431. Moreira ALE, Oliveira MAP, Silva LOS, et al. Immunoproteomic approach of extracellular antigens from *Paracoccidioides* Species Reveals Exclusive B-Cell Epitopes. *Front Microbiol* 2019; **10**: 2968.
432. Campbell LT, Simonin AR, Chen C, et al. *Cryptococcus* strains with different pathogenic potentials have diverse protein secretomes. *Eukaryot Cell* 2015; **14**: 554–563.
433. Kawashima S, Joachim K, Abdelrahim M, et al. Immune checkpoint inhibitors for solid organ transplant recipients: clinical updates. *Korean J Transplant* 2022; **36**: 82–98.

434. Boardman DA, Levings MK. Cancer immunotherapies repurposed for use in autoimmunity. *Nat Biomed Eng* 2019; **3**: 259–263.
435. Ramamurthy D, Nundalall T, Cingo S, et al. Recent advances in immunotherapies against infectious diseases. *Immunotherapy Advances*; **1**. Epub ahead of print 1 January 2021. DOI: 10.1093/immadv/ltaa007.
436. Grimaldi D, Pradier O, Hotchkiss RS, et al. Nivolumab plus interferon- γ in the treatment of intractable mucormycosis. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 18.
437. Banck JC, Mueller N, Mellinghoff SC, et al. Immune checkpoint blockade for aspergillosis and mucormycosis coinfection. *Hemasphere* 2021; **5**: e530.
438. Mellinghoff SC, Thelen M, Bruns C, et al. T-cells of invasive candidiasis patients show patterns of T-cell-exhaustion suggesting checkpoint blockade as treatment option. *J Infect* 2022; **84**: 237–247.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice 1

Identidade de DLD de *P. brasiliensis* do isolado Pb18 com DLD de outros organismos.

Descrição	Nome científico	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len
dihydrolipoyl dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	Paracoccidioides brasiliensis Pb18	1049	100%	0.0	100.00	514
dihydrolipoyl dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis]	Paracoccidioides brasiliensis	1030	100%	0.0	95.18	539
dihydrolipoyl dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	Paracoccidioides brasiliensis Pb03	1029	100%	0.0	94.81	539
dihydrolipoyl dehydrogenase [Paracoccidioides lutzii Pb01]	Paracoccidioides lutzii Pb01	1026	100%	0.0	97.47	514
dihydrolipoyl dehydrogenase [Emergomyces pasteurianus Ep9510]	Emergomyces pasteurianus Ep9510	927	100%	0.0	89.32	515
dihydrolipoamide dehydrogenase [Histoplasma capsulatum G186AR]	Histoplasma capsulatum G186AR	924	100%	0.0	88.93	515
dihydrolipoamide dehydrogenase [Histoplasma ohiense (nom. inval.)]	Histoplasma ohiense (nom. inval.)	924	100%	0.0	88.74	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Emergomyces africanus]	Emergomyces africanus	921	100%	0.0	88.74	515
dihydrolipoamide dehydrogenase [Histoplasma capsulatum H88]	Histoplasma capsulatum H88	920	100%	0.0	88.54	515
dihydrolipoamide dehydrogenase [Histoplasma capsulatum H88]	Histoplasma capsulatum H88	920	100%	0.0	88.54	675
dihydrolipoyl dehydrogenase [Emmonsia crescens UAMH 3008]	Emmonsia crescens UAMH 3008	919	100%	0.0	87.77	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Blastomyces gilchristii SLH14081]	Blastomyces gilchristii SLH14081	919	100%	0.0	88.16	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Emmonsia crescens]	Emmonsia crescens	919	100%	0.0	87.96	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Blastomyces dermatitidis ER-3]	Blastomyces dermatitidis ER-3	916	100%	0.0	87.96	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Blastomyces percursus]	Blastomyces percursus	915	100%	0.0	87.96	515
dihydrolipoamide dehydrogenase [Histoplasma mississippiense (nom. inval.)]	Histoplasma mississippiense (nom. inval.)	912	100%	0.0	87.18	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Helicocarpus griseus UAMH5409]	Helicocarpus griseus UAMH5409	907	100%	0.0	86.58	514

dihydrolipoyl dehydrogenase [Blastomyces parvus]	Blastomyces parvus	899	100%	0.0	86.21	515
dihydrolipoamide dehydrogenase [Paecilomyces variotii]	Paecilomyces variotii	892	100%	0.0	82.88	514
dihydrolipoamide dehydrogenase [Paecilomyces variotii No. 5]	Paecilomyces variotii No. 5	886	100%	0.0	82.49	514
dihydrolipoyl dehydrogenase [Coccidioides immitis RS]	Coccidioides immitis RS	880	100%	0.0	83.27	513
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor, putative [C. posadasii]	Coccidioides posadasii C735 delta SOWgp	879	100%	0.0	83.27	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Emydomyces testavorans]	Emydomyces testavorans	878	100%	0.0	84.05	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	874	100%	0.0	82.88	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	874	100%	0.0	82.88	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	873	100%	0.0	82.68	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	872	100%	0.0	82.68	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	872	100%	0.0	82.68	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	872	100%	0.0	82.68	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	870	100%	0.0	82.49	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus tanneri]	Aspergillus tanneri	870	100%	0.0	84.05	514
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ophidiomyces ophidiicola]	Ophidiomyces ophidiicola	870	100%	0.0	82.30	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus melleus]	Aspergillus melleus	867	100%	0.0	83.14	512
hypothetical protein BDV25DRAFT_164232 [Aspergillus avenaceus]	Aspergillus avenaceus	866	100%	0.0	82.88	512
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus affinis]	Aspergillus affinis	866	100%	0.0	83.27	654
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus steynii IBT 23096]	Aspergillus steynii IBT 23096	865	100%	0.0	83.14	512
uncharacterized protein P175DRAFT_0498303 [Aspergillus ochraceoroseus]	Aspergillus ochraceoroseus IBT 24754	863	100%	0.0	82.68	514
dihydrolipoyl dehydrogenase [Trichophyton rubrum CBS 118892]	Trichophyton rubrum CBS 118892	862	100%	0.0	82.72	512
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus hancockii]	Aspergillus hancockii	860	100%	0.0	82.30	513

uncharacterized protein BDW43DRAFT_96392 [Aspergillus alliaceus]	Aspergillus alliaceus	860	100%	0.0	82.88	512
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus nomiae NRRL 13137]	Aspergillus nomiae NRRL 13137	860	100%	0.0	82.68	512
unnamed protein product [Aspergillus oryzae RIB40]	Aspergillus oryzae RIB40	860	100%	0.0	82.68	512
dihydrolipoamide dehydrogenase [Aspergillus flavus AF70]	Aspergillus flavus AF70	860	100%	0.0	82.49	512
uncharacterized protein BDV27DRAFT_130949 [Aspergillus caelatus]	Aspergillus caelatus	860	100%	0.0	82.68	512
TPA: hypothetical protein A8136_4004 [Trichophyton benhamiae CBS 112371]	Trichophyton benhamiae CBS 112371	860	100%	0.0	82.52	512
uncharacterized protein BDV37DRAFT_271962 [Aspergillus pseudonomiae]	Aspergillus pseudonomiae	860	100%	0.0	82.68	512
dihydrolipoamide dehydrogenase [Aspergillus clavatus NRRL 1]	Aspergillus clavatus NRRL 1	860	100%	0.0	83.07	514
hypothetical protein BDV26DRAFT_129652 [Aspergillus bertholletiae]	Aspergillus bertholletiae	860	100%	0.0	82.49	512
hypothetical protein BDV34DRAFT_229679 [Aspergillus parasiticus]	Aspergillus parasiticus	859	100%	0.0	82.68	512
Dihydrolipoyl dehydrogenase [Penicillium subrubescens]	Penicillium subrubescens	859	100%	0.0	80.97	513
hypothetical protein ASPGLDRAFT_49372 [Aspergillus glaucus CBS 516.65]	Aspergillus glaucus CBS 516.65	858	100%	0.0	80.43	513
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus terreus]	Aspergillus terreus	858	100%	0.0	82.17	515
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus chevalieri]	Aspergillus chevalieri	858	100%	0.0	80.62	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus burnettii]	Aspergillus burnettii	858	100%	0.0	82.68	512
dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor [Aspergillus terreus]	Aspergillus terreus NIH2624	858	100%	0.0	82.17	515
dihydrolipoyl dehydrogenase [Uncinocarpus reesii 1704]	Uncinocarpus reesii 1704	858	100%	0.0	83.85	513
uncharacterized protein BDV38DRAFT_6258 [Aspergillus pseudotamarii]	Aspergillus pseudotamarii	857	100%	0.0	82.49	511
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus puulaauensis]	Aspergillus puulaauensis	857	100%	0.0	82.91	511
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus viridinutans]	Aspergillus viridinutans	857	100%	0.0	82.49	513
hypothetical protein BDV28DRAFT_95029 [Aspergillus coremiiformis]	Aspergillus coremiiformis	857	100%	0.0	82.49	512
hypothetical protein N7494_007830 [Penicillium glabrum]	Penicillium glabrum	856	100%	0.0	80.58	513

Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial [Aspergillus cristatus]	Aspergillus cristatus	855	100%	0.0	80.35	512
Putative Dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus calidoustus]	Aspergillus calidoustus	855	100%	0.0	82.68	513
dihydrolipoamide dehydrogenase [Aspergillus saccharolyticus JOP 1030-1]	Aspergillus saccharolyticus JOP 1030-1	855	100%	0.0	82.10	514
dihydrolipoyl dehydrogenase [Polytolypa hystricis UAMH7299]	Polytolypa hystricis UAMH7299	854	100%	0.0	81.91	513
hypothetical protein CNMCM5878_006014 [Aspergillus fumigatiaffinis]	Aspergillus fumigatiaffinis	854	100%	0.0	82.10	513
hypothetical protein BGY00DRAFT_220214 [Aspergillus carlsbadensis]	Aspergillus carlsbadensis	854	100%	0.0	82.68	513
dihydrolipoamide dehydrogenase [Aspergillus novofumigatus IBT 16806]	Aspergillus novofumigatus IBT 16806	854	100%	0.0	82.30	513
hypothetical protein N7498_007154 [Penicillium cinerascens]	Penicillium cinerascens	853	100%	0.0	80.16	510
D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase [Aspergillus thermomutatus]	Aspergillus thermomutatus	853	100%	0.0	80.76	525
dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial [Aspergillus lentulus]	Aspergillus lentulus	853	100%	0.0	82.30	513
hypothetical protein BJB61DRAFT_211297 [Aspergillus egyptiacus]	Aspergillus egyptiacus	853	100%	0.0	82.14	513
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus taichungensis]	Aspergillus taichungensis	852	100%	0.0	81.91	514
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus campestris IBT 28561]	Aspergillus campestris IBT 28561	852	100%	0.0	81.91	514
Dihydrolipoyl dehydrogenase [Penicillium diatomitis]	Penicillium diatomitis	852	100%	0.0	80.39	513
dihydrolipoamide dehydrogenase [Aspergillus fischeri NRRL 181]	Aspergillus fischeri NRRL 181	851	100%	0.0	82.10	513
hypothetical protein ASPZODRAFT_130802 [Penicillium zonata CBS 506.65]	Penicillium zonata CBS 506.65	851	100%	0.0	81.52	515
hypothetical protein NUU61_000837 [Penicillium alfredii]	Penicillium alfredii	851	100%	0.0	82.14	513
Dihydrolipoyl dehydrogenase [Penicillium oxalicum]	Penicillium oxalicum	850	100%	0.0	80.00	513
uncharacterized protein ASPVEDRAFT_30015 [Aspergillus versicolor CBS 583.65]	Aspergillus versicolor CBS 583.65	850	100%	0.0	79.96	530
Dihydrolipoyl dehydrogenase [Penicillium rolfsii]	Penicillium rolfsii	850	100%	0.0	79.81	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus pseudoviridinutans]	Aspergillus pseudoviridinutans	850	100%	0.0	81.71	513
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus candidus]	Aspergillus candidus	850	100%	0.0	81.71	514

dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus homomorphus CBS 101889]	Aspergillus homomorphus CBS 101889	849	100%	0.0	81.91	514
Dihydrolipoyl dehydrogenase [Penicillium ucsense]	Penicillium ucsense	849	100%	0.0	80.19	513
uncharacterized protein ASPSYDRAFT_32999 [Aspergillus sydowii CBS 593.65]	Aspergillus sydowii CBS 593.65	849	100%	0.0	79.55	531
D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase [Aspergillus turcosus]	Aspergillus turcosus	848	100%	0.0	81.71	513
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Aspergillus udagawae]	Aspergillus udagawae	848	100%	0.0	81.71	513
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus sclerotialis]	Aspergillus sclerotialis	848	100%	0.0	80.65	526
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus aculeatinus CBS 121060]	Aspergillus aculeatinus CBS 121060	848	100%	0.0	81.71	512
dihydrolipoamide dehydrogenase [Aspergillus fumigatus Af293]	Aspergillus fumigatus Af293	848	100%	0.0	81.32	513
hypothetical protein N7486_000508 [Penicillium sp. IBT 16267x]	Penicillium sp. IBT 16267x	848	100%	0.0	81.36	513
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus sp. HF37]	Aspergillus sp. HF37	848	100%	0.0	80.74	514
hypothetical protein LV164_004040 [Aspergillus fumigatus]	Aspergillus fumigatus	847	100%	0.0	81.32	513
uncharacterized protein ASPWEDRAFT_29053 [Aspergillus wentii DTO 134E9]	Aspergillus wentii DTO 134E9	847	100%	0.0	81.52	510
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Ascosphaera atra]	Ascosphaera atra	846	100%	0.0	80.50	517
hypothetical protein N7510_000386 [Penicillium lagena]	Penicillium lagena	845	100%	0.0	81.94	512
dihydrolipoyl dehydrogenase [Aspergillus uvarum CBS 121591]	Aspergillus uvarum CBS 121591	845	100%	0.0	81.52	512
hypothetical protein N7474_005659 [Penicillium riverlandense]	Penicillium riverlandense	845	100%	0.0	81.75	512
uncharacterized protein ASPACDRAFT_76291 [Aspergillus aculeatus]	Aspergillus aculeatus ATCC 16872	845	100%	0.0	81.52	512

8.2 Apêndice 2

8.2.1 Trabalhos de nosso grupo sobre imunoterapia

KM⁺, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection

Ademilson Panunto-Castelo^{1,3,5}, Maria A. Souza^{1,5,6},
Maria-Cristina Roque-Barreira^{2,3,5}, and João S. Silva^{4,5}

³Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-900, Brazil; ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-900, Brazil; ⁵Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-900, Brazil; and ⁶Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

Received on June 18, 2001; revised on August 29, 2001; accepted on August 31, 2001

The outcome and severity of some diseases correlate with the dominance of either the T helper 1 (Th1) or Th2 immune response, which is stimulated by IL-12 or IL-4, respectively. In the present study we demonstrate that gamma interferon (IFN- γ) secretion by murine spleen cells stimulated with KM⁺, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, is due to IL-12 induction, because (1) macrophages from several sources (including cell lines) produced IL-12 p40 in response to KM⁺, and (2) lectin-free supernatants from J774 cell line cultures stimulated with KM⁺ induced the secretion of IFN- γ by spleen cell cultures, an effect blocked by the supernatant pretreatment with anti-IL-12 antibody. The known pattern of susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania major*, attributed to high levels of IL-4 production leading to a Th2 nonprotective immune response, was modified by administration of KM⁺. Draining lymph node cells from these immunized BALB/c mice (in contrast to cells from animals immunized only with soluble leishmanial antigen [SLA]) secreted high levels of IFN- γ and low levels of IL-4, which characterized a Th1 rather than a Th2 response pattern. The footpad thickness of BALB/c mice immunized with SLA plus KM⁺ and challenged with *L. major* was similar to that of uninfected mice. This beneficial effect against leishmanial infection was blocked by pretreatment of these mice with anti-IL-12 antibody. These observations indicate that KM⁺ induces IL-12 p40 *in vivo* and has a protective effect against *L. major* infection.

Key words: *Artocarpus integrifolia*/interleukin 12/KM⁺/lectin/*Leishmania major*

Introduction

When experimentally infected with *Leishmania major*, an obligate intracellular parasite of macrophages in mammalian hosts, mice of several inbred strains (e.g., C57BL/6, C3H, CBA) are resistant to leishmaniasis. In contrast, BALB/c mice are susceptible, develop severe lesions, and do not become immune to reinfection. Murine resistance and susceptibility are genetically determined and clearly related to the development of the polarized CD4⁺ T helper 1 (Th1) and CD4⁺ T helper 2 (Th2) response, respectively (Reiner and Locksley, 1995). The differentiation of CD4⁺ T cells to Th1 and Th2 cells has been associated with production of interleukin-12 (IL-12) (Hsieh *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1995) and IL-4 (Le Gros *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 1992; Seder *et al.*, 1992), respectively. IL-12 is a heterodimeric protein composed of an induced 40-kDa (p40) subunit and a constitutive 35-kDa (p35) subunit. Early IL-12 production by antigen-presenting cells, such as macrophage and dendritic cells, in *L. major* infection is an absolute requirement for developing protective specific immunity (Sypek *et al.*, 1993).

In the innate immune system, cytokine production is usually the result of cell activation, which can be induced by interactions of carbohydrate-recognition molecules with the glycoside part of a receptor on the cell surface. If the recognized receptor is involved in signal transduction pathways, the lectin binding can lead to specific cellular responses, including cytokine release (Villalobo and Gabius, 1998). Some animal, parasite, and plant lectins induce cytokine production, among them those related to the Th1 response, such as interferon- γ (IFN- γ) (Pryjma *et al.*, 1991; Paul and Seder, 1994; Hostanska *et al.*, 1995; Kishko *et al.*, 1997) and IL-12 (Muraille *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000).

KM⁺ and jacalin are structurally related lectins extracted from jackfruit seeds (*Artocarpus integrifolia*) that present distinct sugar specificity and biological properties. Jacalin binds to D-galactose and is highly specific for glycoproteins having a terminal nonreducing α -D-galactosyl residue as well as for the disaccharide Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr (Hortin and Trimpe, 1990). KM⁺ binds to D-mannose and exhibits higher specificity for the trisaccharide present in the core of the N-linked oligosaccharide chains of glycoproteins (Man α 1-3[Man α 1-6]Man) (Rani *et al.*, 1999). Very recently, the sugar specificity of *A. integrifolia* lectins was examined in molecular terms. Although KM⁺ and jacalin share 52% sequence identity and have common evolutionary origin, KM⁺, in contrast to jacalin, is not cleaved posttranslationally in two chains, conserving a glycine-rich linker, which sterically dictates the discrimination between mannose and galactose (Rosa *et al.*, 1999). In terms of

¹These authors contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed

Immunopathology and Infectious Disease

Therapeutic Administration of KM⁺ Lectin Protects Mice Against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection via Interleukin-12 Production in a Toll-Like Receptor 2-Dependent Mechanism

Kely C. Coltri,* Leandro L. Oliveira,*
 Camila F. Pinzan,* Patrícia E. Vendruscolo,*
 Roberto Martinez,† Maria Helena Goldman,‡
 Ademilson Panunto-Castelo,§
 and Maria-Cristina Roque-Barreira*

From the Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos,* Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica,† Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia,‡ Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, and Departamento de Enfermagem Geral e Especializada,§ Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

KM⁺ is a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia* that induces interleukin (IL)-12 production by macrophages and protective T helper 1 immune response against *Leishmania major* infection. In this study, we performed experiments to evaluate the therapeutic activity of jackfruit KM⁺ (jfKM⁺) and its recombinant counterpart (rKM⁺) in experimental paracoccidioidomycosis. To this end, jfKM⁺ or rKM⁺ was administered to BALB/c mice 10 days after infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. Thirty days postinfection, lungs from the KM⁺-treated mice contained significantly fewer colony-forming units and little to no organized granulomas compared to the controls. In addition, lung homogenates from the KM⁺-treated mice presented higher levels of nitric oxide, IL-12, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α , whereas higher levels of IL-4 and IL-10 were detected in the control group. With mice deficient in IL-12, Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, or TLR adaptor molecule MyD88, we demonstrated that KM⁺ led to protection against *P. brasiliensis* infection through IL-12 production, which was dependent on TLR2. These results demonstrated a beneficial effect of KM⁺ on the severity of *P. brasiliensis* infection and may expand its potential use as a novel immunotherapeutic

tic molecule. (Am J Pathol 2008, 173:423–432; DOI: 10.2353/ajpath.2008.080126)

Paracoccidioides brasiliensis is a thermally dimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin America, and which is endemic in Brazil, Argentina, Venezuela, and Colombia. This infection is acquired by inhalation of airborne propagules found in nature, which reach the lungs and are converted to the yeast form.^{1,2} The yeasts can be either eliminated by immune competent cells or spread into tissues through lymphatic or hematogenous routes. As a consequence, the disease may develop into multiple forms, ranging from asymptomatic pulmonary infection to severe and disseminated forms.^{3,4} It has been reported that a high level of humoral immune response is associated with increased disease dissemination.⁵ Conversely, the cell-mediated immune response represents the main mechanism of defense in PCM.¹ Resistance to this mycosis results from the commitment of CD4⁺ T helper (Th) precursors to the Th1 lineage,^{6,7} stimulated by early secretion of interleukin (IL)-12,^{8–10} and followed by sustained secretion of interferon (IFN)- γ .¹¹

IL-12 is primarily produced in response to the interaction of Toll-like receptors (TLR) on phagocytes and dendritic cells with pathogen-associated molecular patterns. More often, the TLR signaling involves the adaptor molecule myeloid differentiation primary response gene 88

Supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (00/09333-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (350418/00-4), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. K.C.C. received a Ph.D. research fellowship from FAPESP (02/12725-5 and 06/60642-2).

Accepted for publication May 13, 2008.

Address reprint requests to Maria-Cristina Roque-Barreira, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14049-900-Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. E-mail: mcrbarre@fmrp.usp.br.

T Helper 1–Inducing Adjuvant Protects against Experimental Paracoccidioidomycosis

Leandro Licursi de Oliveira¹, Kely Cristine Coltri¹, Cristina Ribeiro Barros Cardoso², Maria-Cristina Roque-Barreira¹, Ademilson Panunto-Castelo^{3*}

1 Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **2** Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **3** Department of General and Specialized Nursing, School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

Immunostimulatory therapy is a promising approach to improving the treatment of systemic fungal infections such as paracoccidioidomycosis (PCM), whose drug therapy is usually prolonged and associated with toxic side effects and relapses. The current study was undertaken to determine if the injection of a T helper (Th) 1–stimulating adjuvant in *P. brasiliensis*-infected mice could have a beneficial effect on the course of experimental PCM. For this purpose, mice were infected and treated with complete Freund's adjuvant (CFA), a well-established Th1 experimental inductor, or incomplete Freund's adjuvant (IFA - control group) on day 20 postinfection. Four weeks after treatment, the CFA-treated mice presented a mild infection in the lungs characterized by absence of epithelioid cell granulomas and yeast cells, whereas the control mice presented multiple sites of focal epithelioid granulomas with lymphomonocytic halos circumscribing a high number of viable and nonviable yeast cells. In addition, CFA administration induced a 2.4 log reduction (>99%) in the fungal burden when compared to the control group, and led to an improvement of immune response, reversing the immunosuppression observed in the control group. The immunotherapy with Th1-inducing adjuvant, approved to be used in humans, might be a valuable tool in the treatment of PCM and potentially useful to improve the clinical cure rate in humans.

Citation: de Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CRB, Roque-Barreira M-C, Panunto-Castelo A (2008) T Helper 1–Inducing Adjuvant Protects against Experimental Paracoccidioidomycosis. PLoS NTD 2(3): e183. doi:10.1371/journal.pntd.0000183

Editor: Edgar Carvalho, Hospital Universitário, Brazil

Received: August 29, 2007; **Accepted:** January 7, 2008; **Published:** March 12, 2008

Copyright: © 2008 de Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). LLO was supported by a PhD fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: apcastelo@usp.br

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a thermally dimorphic human pathogenic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin America, being endemic in Brazil, Argentina, Venezuela and Colombia. This infection is acquired by inhalation of airborne propagules found in nature, which reach the lungs and are converted to the yeast form [1,2]. The yeasts can either be eliminated by immune-competent cells or disseminated into tissues through lymphatic or hematogenous routes. PCM is characterized by granulomatous inflammation, intense immunological involvement with suppression of cellular immunity and high levels of non-protective antibodies in serum [3]. The disease may present a broad spectrum of clinical and pathological manifestations ranging from asymptomatic pulmonary infection to severe and disseminated forms [4,5]. The chronic progressive form of the disease (CF) is the most common clinical presentation and predominantly affects adult males, with frequent pulmonary, mucosal, cutaneous and adrenal involvement. Although the outcome of the infection can be due to several factors, it is especially dependent on the protective capacity of the host immune system. The cell-mediated immune response represents the main mechanism of defense in PCM [1]. Conversely, it has been reported that a high level of

humoral immune response is associated with increased disease dissemination [6].

The mechanisms underlying resistance or susceptibility to PCM remain to be elucidated. The development of the appropriate CD4⁺ T helper (Th) subset is important for PCM resolution and several studies have shown that different disease outcomes can be derived from the commitment of precursors to either Th1 or Th2 lineage [7,8]. Resistance to *P. brasiliensis* infection has been related to interferon- γ (IFN- γ) and other Th1-type cytokines [9–11], while susceptibility has been linked to the preferential production of the Th2-type cytokines, i.e., interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 [12–14]. Several investigators have suggested that progressive disseminated forms of PCM in humans are associated with various degrees of suppressed cell-mediated immunity [1,15,16]. This anergy can be reversed after successful therapy, when normal levels of T cell function are partially or completely restored [17].

The prognosis of PCM has been improved through antimycotic drugs, however treatment regimens require an extended period of time often associated with relapses. *P. brasiliensis* has the peculiarity of responding to treatment with sulpha drugs. Nevertheless, regimens with these agents often require extended period of maintenance therapy that may range from months to years. Clinically, the antifungal drugs most commonly used for PCM include amphotericin B, sulpha derivatives and azoles, but their

Author Summary

P. brasiliensis is a thermally dimorphic human pathogenic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin America, whose drug therapy is usually prolonged and associated with toxic side effects and relapses. Although immunostimulatory therapy is a promising approach to improving the treatment of fungal infections as PCM, few studies have been reported. In the current study, we verified that a single-dose administration of an adjuvant that induces T helper (Th) 1 immune response (complete Freund's adjuvant [CFA]) in *P. brasiliensis*-infected mice was sufficient to break the lack of immune response to the fungus observed in infected mice. Four weeks after treatment, the CFA-treated mice presented a mild infection in the lungs characterized by preserved lung structure and small fungal burden, whereas control mice that had been treated with incomplete Freund's adjuvant presented many granulomatous lesions and high fungal burden. The immunotherapy with Th1-inducing adjuvant might be a valuable tool in the treatment of PCM and potentially useful for faster and efficient cure of PCM in humans.

toxicity can be a limiting factor in treatment [18,19]. These concerns, together with the elucidation of the protective immune response against PCM have renewed interest in the development of alternative therapeutic strategies such as immunotherapeutic procedures, which can be useful for controlling PCM. The present study was designed to verify if immunomodulation with CFA could play a protective role in experimental PCM leading to a less severe infection with decreased fungal burdens in the lungs.

Materials and Methods

Fungal isolate

Yeast cells of virulent Pb 18 strain of *P. brasiliensis* were cultured at 37°C in YPD (Yeast Extract/Peptone/Dextrose) Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) for 7 days and washed three times in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. Viability of yeast cells was determined by the fluorescein diacetate-ethidium bromide treatment [20].

Mouse infection and treatment

BALB/c mice, aged 6–8 wk, were bred and maintained under standard conditions in the animal house of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. All animal experiments were performed in accordance with protocols approved by the School of Medicine of Ribeirão Preto Institutional Animal Care and Use Committee. Mice were inoculated intravenously with 1×10^6 viable yeast cells in 100 μ l of PBS. On day 20 postinfection, mice were injected subcutaneously with 100 μ l of CFA or IFA (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), both emulsified in PBS in a ratio of 1:1. Mice were killed on day 30 after treatment and their lungs were aseptically removed. One lung from each mouse was used for histopathology analyses and the other for quantification of fungal burden and cytokines.

Histopathology

The lungs were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or silver methenamine (Grocott) to detect the mycotic structures using standard protocols. Samples were analyzed by light microscopy in an Axiophot

photomicroscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled with a JVC TK-1270 camera (Victor Company of Japan Ltd, Tokyo, Japan). The area of individual granulomas, as well as the total area of the lung sections and the area taken by granulomas per slide, was measured by computer-aided image analysis (ImageJ 1.37v, National Institutes of Health, Bethesda, USA). The following data were thus generated: granuloma area (mean area of all granulomas in each lung section), granuloma relative area (% represented by total granuloma area/total area of the lung sections) and number of granuloma cells per area (total number of cells from a granuloma section/the area of the respective granuloma section) of each mouse.

Quantification of colony-forming units (CFU) and cytokines

The lungs were weighed and homogenized in 1 ml of sterile PBS using tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25 Basic, IKA Works, Inc., Wilmington, USA). To determine the number of CFU, lung homogenates were diluted 1:10 in PBS. Aliquots of 100 μ l of each sample were dispensed into Petri dishes containing brain heart infusion agar (BHI, Difco) supplemented with 4% (v/v) of heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco BRL, Gaithersburg, USA). The plates were incubated at 37°C, the colonies were counted 14 days later, and then, the number of CFU per gram of tissue was calculated. For cytokine determination, remaining lung homogenates were centrifuged at 5,000 $\times g$ for 10 minutes and the supernatants stored at -20°C until cytokine determination. Supernatants were analyzed as duplicate samples from replicate wells. A sandwich-type ELISA was used to determine IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, and TGF- β levels, using OptEIA ELISA kits (BD PharMingen, San Diego, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Inhibition-ELISA for detection of *P. brasiliensis* circulating antigen in serum

Inh-ELISA was performed as previously described [21]. Briefly, inhibition standard curve was constructed by adding different concentrations of *P. brasiliensis* gp43 (from 1 ng to 30 μ g/ml) in 100 μ l of normal serum and then adding 100 μ l of the standardized concentration of monoclonal antibody (MAb) anti-gp43 (10 μ g/ml). Serum samples (100 μ l) were added to 100 μ l of MAb anti-gp43. Normal serum was used as a negative control. Polystyrene plates (Corning Costar Co., Corning, USA) were coated with 500 ng of gp43 in 0.06 M carbonate buffer (pH 9.6) per well (100 μ l/well) overnight at 4°C. After, the plates were blocked by incubation with 200 μ l of 1% bovine serum albumin in PBS per well for 1 h at 37°C; washed 3 times and 100 μ l from inhibition standard curve, samples and controls were added per well and allowed to stand for 2 h at 37°C. After being washed 3 times, 100 μ l of goat anti-mouse immunoglobulin G-peroxidase (Sigma) was added, and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After further washings, the reaction was developed with a solution of o-phenylenediamine (0.5 mg/ml; Sigma) and 0.005% H₂O₂. The reaction was stopped with 4 N H₂SO₄ after 8 to 10 min of incubation in the dark. Optical densities were measured at 490 nm on a PowerWave X microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA). The degree of inhibition in MAb binding was shown to be reciprocal to the concentration of circulating antigen in the sample. The cutoff point was established as the receiver operator characteristic (ROC) curve.

Statistical analysis

Statistical determinations of the difference between means of experimental groups were performed using two-tailed Mann-

Whitney U-test. Differences which provided $P < 0.05$ were considered to be statistically significant. All experiments were performed at least three times.

Results/Discussion

The depression of cell-mediated immune responses has been associated with severe PCM in humans and in the experimental host [1,15,16,22]. However, the propensity for persistence of the fungus in infected tissues appears to be consequence of cell-mediated immune dysregulation with suppression of Th1 and overexpression of Th2 responses [12–14]. To evaluate whether therapeutic immunostimulation is able to interfere in experimental murine PCM and restore the host immune response, we selected immunomodulators for therapy strategy based on the induction of Th1 or Th2 immune response. Since CFA supports a Th1 status, while incomplete Freund's adjuvant (IFA) promotes a Th2 status [23], BALB/c mice were divided into two groups and treated with CFA or IFA on day 20 after infection with *P. brasiliensis*. The progression of *P. brasiliensis* infection was determined by lung histopathology and analysis of colony-forming unity (CFU), parameters that are considered trustworthy to discriminate susceptible and resistant mice to systemic fungal infection [9,12,19,24]. At 20 days of infection the mice presented 5.8×10^4 CFU/g of lung tissue (Figure 1A, dashed line) and compact granulomas (data not shown), for this reason, this time was chosen for the treatment regimens. On day 30 after treatment (50 days postinfection), the lungs from IFA-treated mice presented multiple sites of focal and confluent epithelioid granulomas with

lymphomonocytic halos circumscribing a high number of viable and nonviable yeast cells (Figure 2A, C and E). Morphometric analysis of the lungs from IFA-treated mice revealed a number of granulomas of 41 ± 5.2 , with a relative area of $40.7 \pm 6.2\%$. These granulomas presented $12.2 \pm 1.8\%$ of yeast cells and $6 \pm 0.6\%$ collagen (data not shown). In contrast, in the *P. brasiliensis*-infected mice treated with CFA, no granulomas or yeast cells were seen in the pulmonary sections examined and a well-preserved alveolar architecture was observed on day 30 after treatment (Figure 2B, D and F). Most importantly, the treatment with CFA induced a 2.4 log reduction in the fungal burden when compared to the IFA-treated mice, corresponding to 99% less CFU (Figure 1A). The CFU data are in agreement with the histopathology analyses, pointing out that therapeutic immunostimulation led to an increased clearance of fungal burden from lungs.

In order to evaluate the impact of the treatment with adjuvant, the animals were weighed weekly until the study end point. We observe that the animals of therapy group gained more weight (20%) than the control group (data not shown). These results can be correlated with a good prognostic in the PCM.

When we analyzed the production of pro and anti-inflammatory cytokines in the supernatants of lung homogenates from the *P. brasiliensis*-infected BALB/c mice treated with CFA or IFA, we observed that the IFA-treated group produced low levels of IFN- γ , IL-4, IL-12, TNF- α , IL-10 and TGF- β (Figure 1B–G), suggesting a suppression of the immune response in these animals. In contrast, CFA-treated mice produced high levels of these pro and anti-inflammatory cytokines (Figure 1B–G). Although many reports have demonstrated that the Th2 pattern is associated with a severe

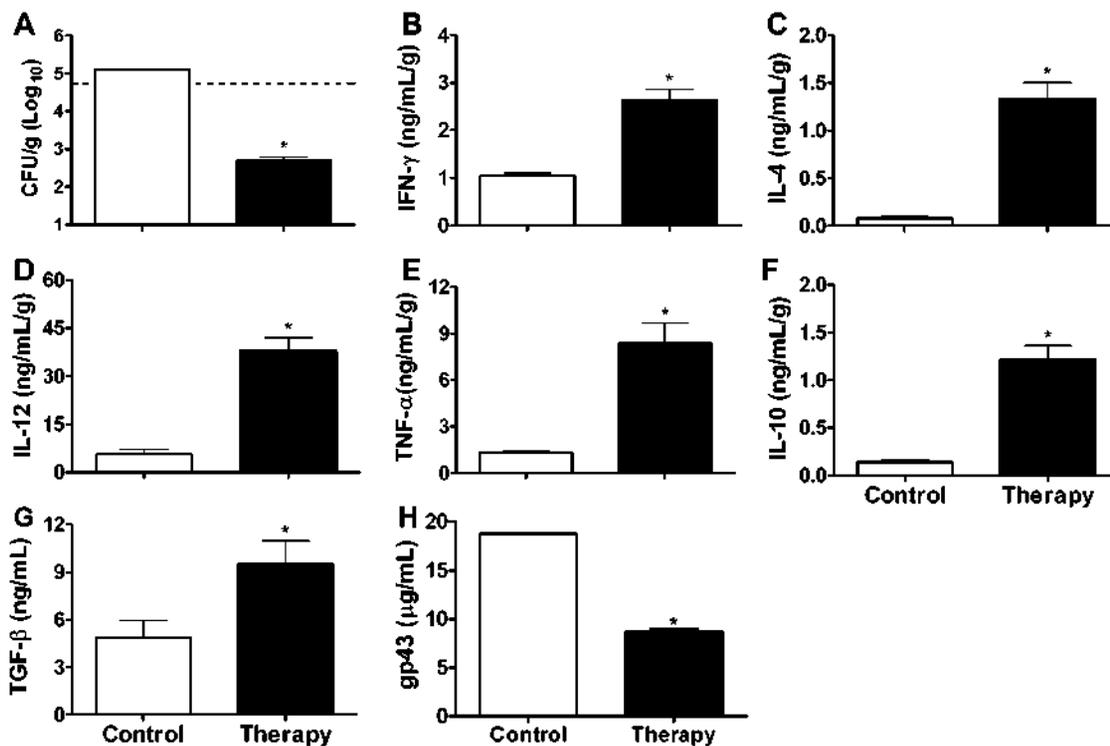


Figure 1. *P. brasiliensis*-infected mice treated with CFA present remarkable decrease of fungal burden and increase of cytokines production. Mice inoculated with 1×10^6 yeast cells were treated with CFA (therapy) or IFA (control) on day 20 postinfection. The lung homogenates obtained from these mice on day 30 after treatment were analyzed for CFU (A), IFN- γ (B), IL-4 (C), IL-12 (D), TNF- α (E), IL-10 (F), TGF- β (G). In the same period the levels of *P. brasiliensis* circulating antigen was analyzed in serum (H). Dashed line in panel A represents the amount of viable yeasts at the day of treatment (20 days postinfection). Data are reported as the mean \pm standard deviation for three mice per group performed in duplicate. * $P < 0.05$ compared to control group (two-tailed Mann-Whitney U-test). doi:10.1371/journal.pntd.0000183.g001

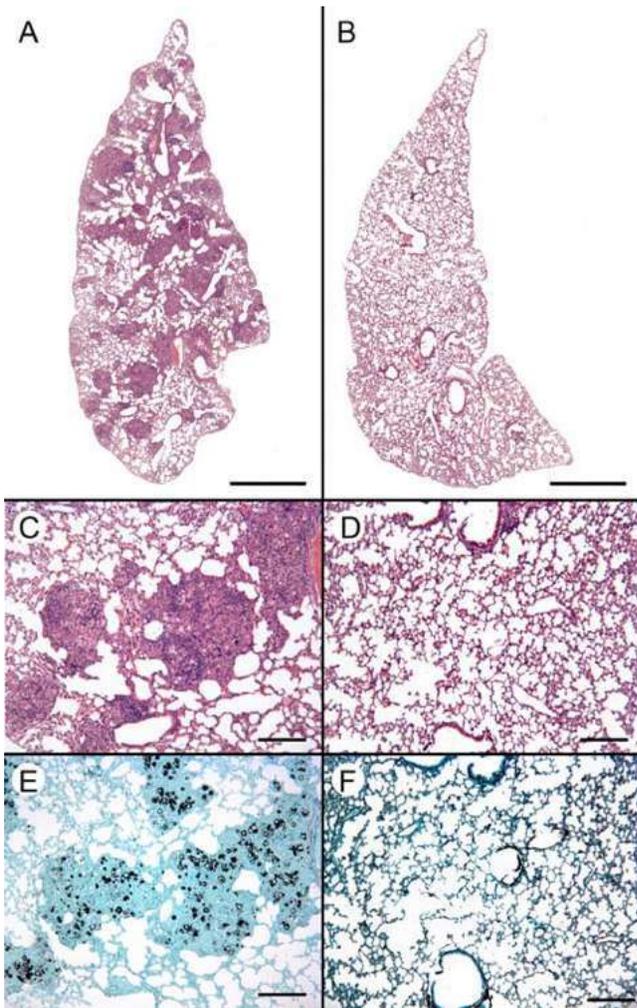


Figure 2. Therapy with CFA leads to resolution of the pulmonary lesions in *P. brasiliensis*-infected mice. *P. brasiliensis*-infected mice were treated with IFA (A, C and E) or CFA (B, D and F) 20 days postinfection. The lung sections obtained at day 30 after treatment were fixed in formalin, paraffin embedded, cut into 5 μ m sections, stained with H&E (A–D) or Grocott (E and F), and analyzed by light microscopy. Scale bars on panels A and B indicate 1 mm, on D–G 200 μ m.

doi:10.1371/journal.pntd.0000183.g002

disease, whereas a Th1-biased immune response is linked to the asymptomatic and mild forms of PCM [9–14], others have shown that the induction of inflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , can lead to overproduction of nitric oxide that has been associated with suppression of cell immunity [25–27]. Recently, it was demonstrated that the anti-inflammatory Th2 cytokine IL-4 has a dual role in PCM, leading to a protective or a disease-promoting effect depending on the genetic background of the host [28]. Regarding TGF- β , we observed that this cytokine is produced by pulmonary epithelium, so we hypothesized that it might contribute to the lung tissue renewal (unpublished data). In this study we obtained an effective protection against *P. brasiliensis* infection even in the presence of anti-inflammatory cytokines, suggesting that, in this therapy model, the protective effect against PCM seems to be dependent on the induction of a mixed Th1/Th2 immune response pattern. The production of both inflammatory and anti-inflammatory cytokines is extremely helpful to

balance the immune response, since anti-inflammatory cytokines can control the inflammatory responses, which can result in local pathology and systemic and centrally controlled adverse events. CD4⁺ T cells also play a role in the regulation of inflammation [29]. On the basis of the differences between the groups treated with CFA or IFA, we suggest that the protection induced by CFA injection was due to a noticeable increase in the pulmonary levels of cytokines, which probably broke the immunosuppression status observed in the infected mice treated with IFA. Nonetheless, we cannot exclude the involvement of other mechanisms, such as modulation by regulatory T cells [30], apoptosis in the antigen-specific T cells [31], and Fas-FasL and CTLA-4 expression [32].

The levels of circulating antigen in the mice infected and treated with IFA were two-fold higher than those treated with CFA (Figure 1H). These results supported by other reports that showed that the depression of cell-mediated immunity is associated with the high levels of specific circulating antibodies or soluble antigens in disseminated disease [13,15,21].

Although many studies on protection against PCM have been performed, only few of them have reported the efficacy of the immunostimulatory therapy. In one of these studies, the therapy with peptide p10 from gp43, emulsified in CFA, and chemotherapy was used in an attempt to improve the treatment of PCM [33]. The combined treatment showed a beneficial effect when administered at 48 h or 30 days after challenge. However, the control mice that received only CFA and the non-immunized mice presented similar lung fungal burden. These data are in contrast to those observed herein. This difference might be due to distinct experimental protocols used, such as challenge route, dose, and treatment regimen. Nevertheless, other reports have demonstrated that the use of immunostimulatory therapy can lead to a positive prognostic in fungal diseases [34–36]. Basically, therapeutic immunostimulation can be used by reinforcing or broadening defenses when specific immune responses are unable to do this during the natural course of the PCM.

The present study demonstrated that a single-dose administration of the Th1-inducing adjuvant (CFA) in *P. brasiliensis*-infected mice was sufficient to break the anergy observed in these animals restoring their ability to mount an effective immune response to the fungus. While the control mice presented large amount of yeasts and extensive sites of parenchymal lung injury, the CFA-treated mice were capable to control not only the fungal systemic dissemination but also its growth, leading to a noticeable fungal clearance without apparent lung injury. Our results indicate that Th1-inducing adjuvant proved to be a valuable tool in the treatment of PCM. Overall, these data open new possibilities for the potential use of Th1-inducing adjuvant not only as a sole therapy but also as an adjunct to conventional antifungal therapy against PCM, improving the regular chemotherapy and reducing the time of treatment.

Acknowledgments

We thank Denise B. Ferraz and Patrícia E. Vendruscolo for the excellent technical assistance, Prof. Dr. Rosana Puccia for generously providing gp43 to the inhibition-ELISA experiments, and Prof. Dr. João Santana da Silva for helpful discussions during the course of the studies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LO AP. Performed the experiments: LO KC CC. Analyzed the data: LO KC CC AP. Contributed reagents/materials/analysis tools: LO MR AP. Wrote the paper: LO KC AP.

References

1. Brummer E, Castañeda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6: 89–117.
2. McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A (1987) Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25: 165–175.
3. San-Blas G (1993) Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 31: 99–113.
4. Almeida SR, Moraes JZ, Camargo ZP, Gesztesz JL, Mariano M, et al. (1998) Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 190: 68–76.
5. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, et al. (1987) Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 129–132.
6. Arango M, Oropeza F, Anderson O, Contreras C, Bianco N, et al. (1982) Circulating immune complexes and in vitro cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 79: 153–158.
7. Scott P, Kaufmann SH (1991) The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol Today* 12: 346–348.
8. Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A (1989) Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 112: 161–182.
9. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, Andre D, Xidieh CF, et al. (1998) Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 66: 800–806.
10. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE (2000) Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 68: 2546–2552.
11. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeiffer K, Rossi MA, et al. (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 156: 1811–1820.
12. Diniz SN, Cisalpino PS, Freire AT, Silva-Teixeira DN, Contigli C, et al. (2001) In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol* 62: 799–808.
13. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH (2002) Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 4: 139–144.
14. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, et al. (2003) Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 5: 413–418.
15. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ (1997) Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis* 175: 1263–1267.
16. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, et al. (2001) Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 13: 248–252.
17. Ferreira KS, Almeida SR (2006) Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Immunol Lett* 103: 121–126.
18. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A (1994) Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo AM, Del Negro G, eds (1994) Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press. pp 373–392.
19. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 10: 80–87.
20. Calich VL, Purchio A, Paula CR (1979) A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia* 66: 175–177.
21. Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Queiroz-Telles F, et al. (2003) Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 41: 3675–3680.
22. Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peracoli MT, Audi RC, Mendes RP, et al. (1985) Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 765–772.
23. Shibaki A, Katz SI (2002) Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 11: 126–134.
24. Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich LG (1993) Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol* 94: 75–79.
25. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, et al. (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* 161: 3056–3063.
26. Bocca AL, Silva MF, Silva CL, Cunha FQ, Figueiredo F (1999) Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 61: 280–287.
27. Nascimento FR, Calich VL, Rodriguez D, Russo M (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 168: 4593–4600.
28. Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, Kashino SS, Fazioli RA, et al. (2004) Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun* 72: 3932–3940.
29. Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787–793.
30. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, et al. (2006) Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol* 177: 5811–5818.
31. Cacere CR, Romano CC, Mendes Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G (2002) The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol* 105: 215–222.
32. Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, et al. (2003) Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis* 187: 1496–1505.
33. Marques AF, da Silva MB, Juliano MA, Travassos LR, Taborda CP (2006) Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2814–2819.
34. Meira DA, Pereira PC, Marcondes-Machado J, Mendes RP, Barraviera B, et al. (1996) The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 55: 496–503.
35. Serrano-Jaen L, Mendez-Tovar LJ, Almeida-Arvizu V, Manzano-Gayosso P, Cordova-Martinez E, et al. (2006) Dermatofitosis diseminada cronica asociada a fagocitosis deficiente tratada con antimicoticos e inmunostimulacion fagocitaria. *Gac Med Mex* 142: 415–417.
36. Casadevall A, Pirofski LA (2001) Adjunctive immune therapy for fungal infections. *Clin Infect Dis* 33: 1048–1056.

RESEARCH ARTICLE

Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* Infection

Fabrcio Freitas Fernandes¹, Leandro Licursi de Oliveira², Taise Natali Landgraf³, Gabriela Peron⁴, Marcelo Vieira Costa⁵, Arlete A. M. Coelho-Castelo³, Vânia L. D. Bonato³, Maria-Cristina Roque-Barreira¹, Ademilson Panunto-Castelo^{5*}

1 Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **2** Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, **3** Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **4** Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, **5** Department of Biology, Ribeirão Preto Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

* apcastelo@usp.br



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Fernandes FF, Oliveira LLd, Landgraf TN, Peron G, Costa MV, Coelho-Castelo AAM, et al. (2016) Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. PLoS ONE 11(9): e0162486. doi:10.1371/journal.pone.0162486

Editor: Floyd L. Wormley, Jr., University of Texas at San Antonio, UNITED STATES

Received: April 8, 2016

Accepted: August 7, 2016

Published: September 6, 2016

Copyright: © 2016 Fernandes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: APC (Grant #2009/14777-1, and #2013/12278-3), FFF (# 2009/03235-3), and TNL (# 2012/08552-0) were supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The genus *Paracoccidioides* comprises species of dimorphic fungi that cause paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic disease prevalent in Latin America. Here, we investigated whether administration of native 60-kDa heat shock protein of *P. brasiliensis* (nPbHsp60) or its recombinant counterpart (rPbHsp60) affected the course of experimental PCM. Mice were subcutaneously injected with nPbHsp60 or rPbHsp60 emulsified in complete's Freund Adjuvant (CFA) at three weeks after intravenous injection of *P. brasiliensis* yeasts. Infected control mice were injected with CFA or isotonic saline solution alone. Thirty days after the nPbHsp60 or rPbHsp60 administration, mice showed remarkably increased fungal load, tissue inflammation, and granulomas in the lungs, liver, and spleen compared with control mice. Further, rPbHsp60 treatment (i) decreased the known protective effect of CFA against PCM and (ii) increased the concentrations of IL-17, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10, and TGF- β in the lungs. Together, our results indicated that PbHsp60 induced a harmful immune response, exacerbated inflammation, and promoted fungal dissemination. Therefore, we propose that PbHsp60 contributes to the fungal pathogenesis.

Introduction

The genus *Paracoccidioides* includes species of dimorphic fungi that cause paracoccidioidomycosis (PCM), a granulomatous systemic mycosis prevalent in Latin America [1–3]. *Paracoccidioides* fungi are thermally dimorphic and grow as hypha at the environmental temperature and as yeast at 35°C–37°C. Fungal morphologic transition is essential for establishing an infection because infective conidia or mycelial fragments are inhaled and converted to pathogenic yeast forms in the host lungs [4, 5]. Prevalence of PCM is higher in men in rural areas who are

involved in activities related to the management of contaminated soil and plants [6]. *P. brasiliensis* may also affect immunocompromised individuals as an occasional opportunistic infection that results in severe clinical manifestations and a high mortality rate [7]. Fungal invasion of host tissues induces inflammation characterized by macrophage activation and granuloma formation, which controls the dissemination of *Paracoccidioides* yeasts to other organs [8].

Clinical manifestations of *Paracoccidioides* infection may be directly associated with fungal factors, such as virulence and pathogenicity [9], or are related to host factors, such as genetic susceptibility and immune competence [10, 11]. However, fungal and host factors are intricately connected to each other because disease outcome depends on the interaction of fungal components with receptors on host phagocytic cells [12]. For this reason, strains of *P. brasiliensis*, which is the most studied species of the genus *Paracoccidioides*, have variable degrees of virulence and, consequently, can induce different host responses [13]. Interestingly, Bonfim et al. [13] described that less virulent *P. brasiliensis* strain is preferably recognized by receptors dec-1 and Toll-like receptor (TLR) 2 present on innate immune cells and induce the production of balanced amounts of TNF- α and IL-10. On the other hand, most virulent *P. brasiliensis* strain promotes the production of TNF- α but not IL-10. These observations suggest that less virulent *P. brasiliensis* strains induce a more controlled response because IL-10, an anti-inflammatory cytokine, prevents host tissue injury that may result from TNF- α activity [13].

Several studies have identified and characterized components of *Paracoccidioides* fungi involved in their infection and pathogenicity to better understand their biology and interactions with host cells and to identify potential vaccine targets. Lipids, polysaccharides, and proteins were already mentioned as able to increase fungal pathogenicity [14, 15]. Studies with plasmid DNA cloned with the gene of heat shock protein (Hsp) of 65-kDa from *Mycobacterium leprae* [16] and with the gene encoding the P10 peptide from gp43 [17] have shown therapeutic effects in experimental PCM. *P. brasiliensis* proteins are the most studied because of their high immunogenicity. For example, gp43, which is the most studied component of *P. brasiliensis* yeasts, has significant potential for application in vaccine development or immunotherapy against PCM [15]. Also, a 27-kDa component of *P. brasiliensis* is under investigation for its use in the prophylaxis and treatment of PCM [18]. The rPb27 and rPb40, in addition to fluconazole chemotherapy, showed an additive protective effect [19, 20]. Moreover, the *P. brasiliensis* lectin, paracoccin, by interacting with TLR2 N-glycans on host cells, establishes protective responses against PCM [21].

To identify *P. brasiliensis* antigens that contributed to its pathogenicity and that could serve as potential vaccines or therapeutic targets, we examined *P. brasiliensis* components that bind to immobilized fetuin. Interestingly, the major component of the fetuin-bound fraction was identified as the heat shock protein of *P. brasiliensis* and the preparation was designed as nPbHsp60. Its administration or the administration of its recombinant counterpart (rPbHsp60) induced detrimental effects in *P. brasiliensis*-infected mice. Therefore, we propose that PbHsp60 contributes to the fungal pathogenesis.

Materials and Methods

Mice and Ethics Statement

This study was conducted in accordance with the ethical principles of animal research adopted by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Ribeirão Preto Medical School, USP (protocol: 146/2007). Male BALB/c mice between 6–8 weeks of age and weighing 20–25 g ($n = 5/\text{group}$) were obtained from the Animal Facility of Ribeirão Preto Campus and were maintained at the Animal Facility of Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (USP). They were acclimated to

the facility for one week prior to initiating the experiment, housed in individually ventilated cages, light-tight cabinets (Alesco, Capivari, Brazil), maintained at 20–22°C, a 12 h light-dark cycle, and with access to chow and water *ad libitum*. All cages were cleaned twice a week and bedded with autoclaved soft wood shavings.

Fungal Isolate

Yeast cells of a highly virulent *P. brasiliensis* strain (Pb18) were cultured on YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) and were incubated at 36°C for 7 days. Virulence and viability of the yeast cells were maintained as described previously [22, 23]. Briefly, the virulence was maintained by constant mice infections and recovery of Pb18 strain. The viability was performed by the fluorescein diacetate-ethidium bromide treatment. Only suspensions containing >90% viable cells were used for infecting mice.

Antigen Preparation

Cultured yeast cells were harvested by centrifugation at $7,000 \times g$ at 4°C for 10 minutes, washed with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and disrupted by sonication on ice (five cycles of 1 minute each) at 200 W (Unique UltraSonic Mixing, mod. DES 500, 4 mm probe; Unique Group, Indaiatuba, Brazil), followed by centrifugation at $7,000 \times g$ at 4°C for 10 minutes. Supernatant containing *P. brasiliensis* soluble antigens (PbAgs) was filtered through a 0.22- μ m filter (Millipore, Billerica, USA). Approximately 5 mg PbAgs were resolved by performing chromatography with a 5-mL fetuin—agarose column (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) that was previously equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). After washing with 10 column volumes (cv) of the equilibrating buffer, the column was sequentially eluted using 5 cv of 0.4 M D-glucose, D-mannose, D-galactose, or α -lactose in PBS or with 1 M NaCl in PBS. The eluted fractions were dialyzed against water by using centrifugal filtration devices with a molecular weight cut-off of 10,000 kDa (Millipore). Concentration of proteins eluted with 1 M NaCl was determined using a BCA kit (Pierce Chemical Co., Rockford, USA).

Electrophoresis and Protein Identification

Eluted protein and rPbHsp60 (~5 μ g) were resuspended in 5 \times loading buffer (500 mM Tris-HCl [pH 6.5], 2.5% SDS, 10% glycerol, 2.5% β -mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) and were heated at 100°C for 3 minutes. Next, the preparations were resolved by performing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12.5% by using Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). The gels were stained with Coomassie brilliant blue G250 (USB Corporation, Cleveland, USA). Proteins with known molecular masses were used as standards (LMW-SDS Marker Kit; GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England). A semi-quantitative analysis of the relative amount of 68-kDa protein band was carried out by converting the density of protein bands in the gel picture using the ImageJ 1.37v software (National Institutes of Health, Bethesda, USA) as the percent of the total gel density. Next, 60-kDa bands from column-eluted fraction and rPbHsp60 were excised from the gel, were digested *in situ* with trypsin. Peptides were extracted from gel and dried in SpeedVac, resuspended in 50 μ l 1% formic acid, centrifuged and transferred to HPLC vial. Ten μ l sample was typically analyzed on the system. All mass spectrometry analyses were performed on an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer equipped with an Agilent 1200 series liquid chromatograph and an Agilent Chip Cube LC-MS interface (1D nLC-MS-MS) at the FingerPrint Proteomics and Mass Spectrometry Facility, College of Life Sciences, University of Dundee. Mascot (version 2.3; Matrix, United Kingdom) analysis was performed to identify peptides and to search for proteins in the NCBI nonredundant (nr) database. The identified

peptides were searched against NCBI *E. coli* database to find possible bacterial protein contaminants in the sample.

Cloning of *P. brasiliensis* cDNA Encoding PbHsp60

Total RNA was extracted from *P. brasiliensis* yeast culture by using Trizol (Life Technologies, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed using oligo-dT₁₂₋₁₈ primer (Life Technology) and SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) for synthesizing cDNA. To amplify the cDNA region encoding PbHsp60 were used the oligonucleotide primers 5'-CGAATTCATGATGCAGCGAGCTTTTACTTCCT-3' (sense) and 5'-CTCGAGGAACATACCCCGCCCATAC-3' (antisense) and high-fidelity *Taq* polymerase (Life Technologies). The amplified fragment was cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, USA) and was sequenced at the Center for Human Genome Studies, Institute of Biosciences, USP. Next, the fragment was removed from the pGEM-T vector by using EcoRI and XhoI and was subcloned into pET28a vector (Novagen, San Diego, USA).

Expression and Purification of rPbHsp60 in *Escherichia coli*

E. coli transformed with pET28a-HSP60 vector were grown in LB medium (3 L) supplemented with kanamycin sulfate (50 µg/mL) in a shaking incubator at 180 rpm and 37°C until optical density at 600 nm reached 0.5. Next, 0.4 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside was added to the culture medium to induce the expression of the recombinant protein. After 6 hours, bacterial cells were harvested by centrifugation at 3,000 × g, were resuspended in a buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 30 mM imidazole [pH 8.0]), and were lysed by sonication. Lipopolysaccharide and other bacterial contaminants were removed from the sample by washing it at least five times with a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 0.5% Triton X-100 (pH 8.0) through centrifugation at 10,000 × g [24]. Pellet containing the insoluble fraction (inclusions bodies) was resuspended in a denaturing solubilization buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, 7 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 0.5% Tween 20 [pH 8.0]) and was incubated for 1 hour at room temperature. The denatured material was recovered by centrifugation at 10,000 × g and was filtered through Millex-GV PVDF (pore size, 0.22 µm; Millipore). The recombinant protein was purified by performing metal chelate affinity chromatography with a Ni²⁺-Sephacryl affinity column (His-Trap; GE Healthcare). Next, the recombinant protein was eluted with elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 7 M urea, and 5 mM 2-mercaptoethanol), refolded by dialysis against PBS, and concentrated by ultrafiltration. Protein concentration was determined using Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Pierce Chemical Co.). Purity, size, and identity of the recombinant protein were evaluated using SDS-PAGE and 1D nLC-MS-MS, similar to those described above for column-eluted fraction. The rPbHsp60 preparation contained less than 0.05 ng/mL of bacterial endotoxin, as determined by the *Limulus amoebocyte* lysate assay (Sigma Chemical Co.).

Experimental Treatment Protocol

Mice were intravenously inoculated by retro-orbital plexus with 1 × 10⁶ viable yeast cells and daily monitored for signs of distress or illness, and mortality. None of them became seriously ill or died prior to the experimental endpoint. On day 21 postinfection, the mice were divided into groups containing five animals each. In experiments involving nPbHsp60, the mice were subcutaneously injected with a single 100 µL dose of one of the following preparations: (1) 25 µg nPbHsp60 in PBS, (2) 25 µg nPbHsp60 in PBS and emulsified in CFA (Sigma Chemical

Co.) (nPbHsp60 + CFA, 1:1), (3) PBS emulsified in CFA, and (4) only PBS. In the experiments with recombinant protein, 50 μ g of rPbHsp60 were used. On day 30 after the treatment, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) mixture and submitted to euthanasia by cervical dislocation. Their lungs, livers, and spleens were removed aseptically for performing histopathological analyses and for quantifying fungal load and cytokine levels.

CFU, Tissue Injury and Cytokine Profile Evaluation

The right lungs and half portions of the livers and spleens were weighed and homogenized in 1 mL sterile PBS by using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25 Basic; IKA Works, Inc., Wilmington, USA). Colony-forming units (CFU) of *P. brasiliensis* yeast cells were determined as described previously [23, 25]. For determining cytokine levels, the organ homogenates were centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 minutes and their supernatants were stored at -20°C .

The left lungs and approximately half portions of the livers and spleens were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours and were embedded in paraffin. Next, the tissue sections (thickness, 5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) by using standard protocols and were analyzed by performing light microscopy with Axiophot photomicroscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled with JVC TK-1270 camera (Victor Company of Japan Ltd, Tokyo, Japan). Total area of the lung sections and inflammatory infiltrates of *P. brasiliensis* yeasts per lung section were measured using a computer-aided image analysis software (ImageJ 1.37v; National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Concentrations of IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12, and TGF- β in the lung homogenates were measured by performing capture ELISA with OptEIA ELISA sets (BD Pharmingen, San Diego, USA), according to the manufacturer's protocol. Cytokine concentrations were determined by referring to a standard curve for serial two-fold dilutions of recombinant murine cytokines.

Statistical Analysis

Statistical differences among means of different experimental groups were determined using one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. All the experiments were performed at least three times.

Results

Isolation and Identification of 60 kDa Protein Isolated from PbAgs

A preparation of PbAgs was affinity chromatographed on an immobilized fetuin column. The bound proteins could not be eluted using carbohydrate solutions (0.4 M D-glucose, D-mannose, D-galactose, or α -lactose). Otherwise, protein elution was achieved by using 1 M NaCl solution in PBS, a fraction containing a 60-kDa major band on SDS-PAGE (Fig 1A) that comprised 68% of all proteins in the sample. The 60-kDa protein band was digested with trypsin and the one dimensional nano-LC-MS/MS analysis of tryptic fragments revealed that 141 peptides matched the sequence of PbHsp60 (GenBank accession number: XP_010763632.1), resulting in a sequence coverage of 43% (S1 Fig and S1 Table). Because Hsp are protein highly conserved across the species, when we blasted the MS peptide sequences against the *E. coli* database, no correlation with *E. coli* GroEL or other proteins was found. Therefore, this enriched preparation of PbHsp60 was designed nPbHsp60, which was used, as indicated, in subsequent experiments.

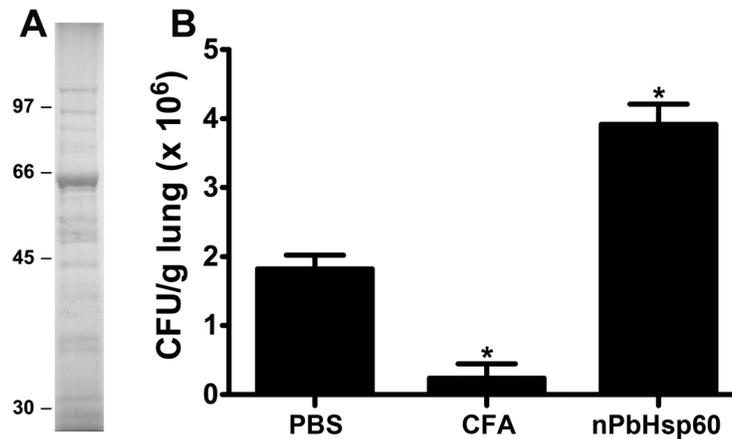


Fig 1. Native PbHsp60 increase fungal load in *P. brasiliensis*-infected mice. (A) Isolation of nPbHsp60 from *P. brasiliensis* by using a fetuin—agarose column equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Chromatography was monitored spectrophotometrically at 280 nm. The fraction eluted with 1 M NaCl was concentrated, dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and analyzed by performing SDS-PAGE with a 12.5% gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Migration positions of molecular mass markers are shown on MW in kDa. (B) Mice injected with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated with or without CFA or nPbHsp60 on day 21 postinfection. Lung homogenates were obtained from these mice on day 30 after the treatment and were analyzed for the CFU of *P. brasiliensis* yeast. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of five mice per group; * $P < 0.05$ compared to the other groups.

doi:10.1371/journal.pone.0162486.g001

Detrimental Effects of nPbHsp60 Administration to Mice with Experimental PCM

In initial experiments, we evaluated the effect of nPbHsp60 treatment on the course of experimental PCM in mice. Mice infected with *P. brasiliensis* yeast cells for 3 weeks were injected with nPbHsp60 or control preparations. The nPbHsp60-treated mice showed increased fungal load compared with PBS- or CFA-treated mice (Fig 1B). Treatment with CFA, an efficient inducer of Th1 response in *P. brasiliensis* infection [23], remarkably decreased the CFUs of *P. brasiliensis* yeasts in the lungs compared with treatment with PBS (Fig 1B).

Next, we determined whether the administration of nPbHsp60 changed the beneficial effects of CFA-treatment. Intriguingly, when the *P. brasiliensis*-infected mice were treated with nPbHsp60 (25 μ g) emulsified in CFA (nPbHsp60 + CFA), they had numbers of CFU on day 30 after treatment, at least, 2-fold higher than those detected in CFA-treated mice and quite similar to those in the lung from PBS-treated mice (infection control) (Fig 2A). These results indicate that the CFA effect in restraining fungal growth was decreased by nPbHsp60. Moreover, histological analysis showed an extensive lesion area (Fig 2B) with numerous granulomas containing high yeast load (Fig 2E) in the lungs of nPbHsp60 + CFA-treated and negative control mice (Fig 2C). In contrast, analysis of lung sections of *P. brasiliensis*-infected mice treated with CFA alone showed well-preserved bronchoalveolar architecture, with no detectable granulomas or yeast cells (Fig 2D). Moreover, no granulomas and yeast cells were detected in the livers and spleens of these mice. Together, these results supported the hypothesis that nPbHsp60 treatment impaired the beneficial effect of CFA against PCM.

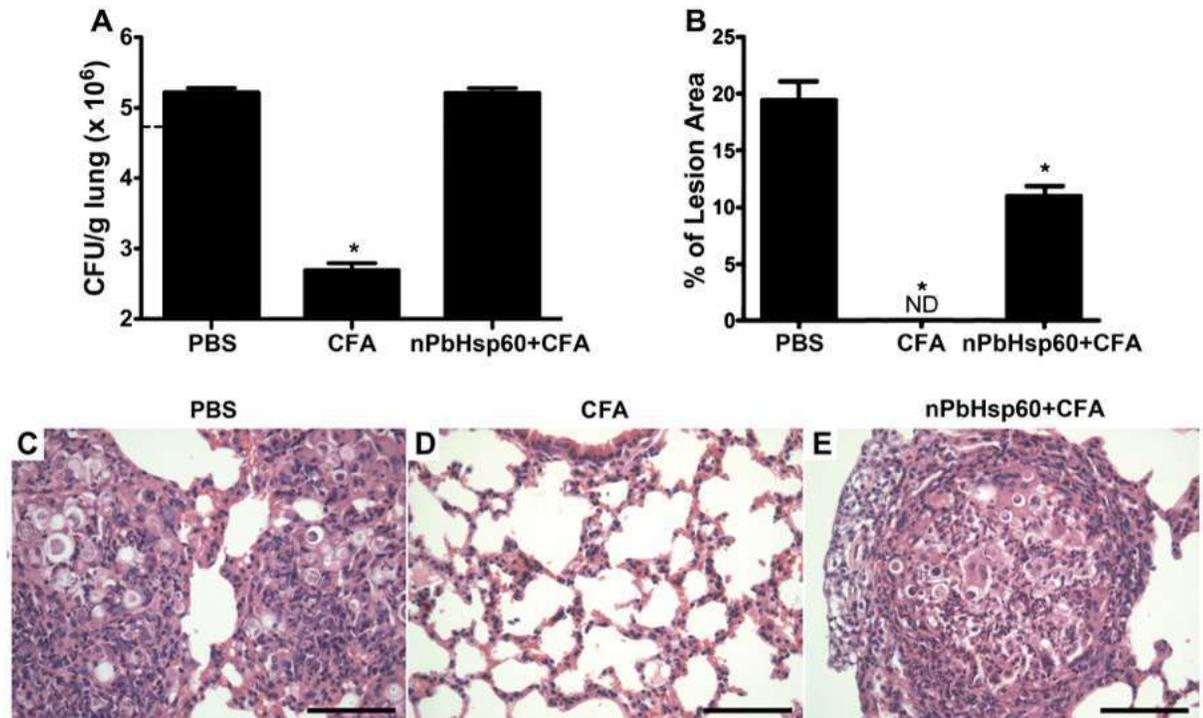


Fig 2. Native PbHsp60 reverse the beneficial effect of CFA on experimental PCM. Mice injected with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated with PBS, CFA, or CFA-emulsified nPbHsp60 (nPbHsp60 + CFA) on day 21 postinfection. (A) Lung homogenates were obtained from these mice on day 30 after the treatment and were analyzed for the CFU of *P. brasiliensis* yeast cells. (B–E) Lung tissues obtained on day 30 after the treatment were fixed in formalin, embedded in paraffin, cut into 5- μ m sections, stained with H&E, and analyzed by light microscopy. Scale bars indicate 200 μ m. (B) Morphometric analyses were performed using lung sections obtained from *P. brasiliensis*-infected mice treated with (C) PBS, (D) CFA, or (E) nPbHsp60 + CFA. Percentage lesion area was measured using a computer-aided image analysis software. Data are expressed as mean \pm standard deviation; ND, not detected; * $P < 0.05$ compared with the other groups.

doi:10.1371/journal.pone.0162486.g002

rPbHsp60 Reproduces the nPbHsp60 Effects on the Experimental PCM Course

To validate our presumption that PbHsp60 was responsible for the activities exerted by the fetuin-bound fraction, we expressed rPbHsp60 in pET-28a-*HSP60*-transformed *E. coli* cells and purified it by performing His-Trap chromatography. We analyzed the obtained protein by SDS-PAGE, which produced a single band with apparent molecular mass of 60-kDa. MS analysis confirmed that the recombinant protein was PbHsp60. No correlation with *E. coli* proteins was found when we blasted the MS peptide sequences against the *E. coli* database. This rPbHsp60 was biologically assayed by using the protocols adopted for experiments performed using nPbHsp60. At 51 days post-infection, i.e., 30 days after treatment of the *P. brasiliensis*-infected mice, we compared the fungal load and inflammation in the lungs, liver, and spleen of mice that received rPbHsp60 + CFA as treatment with those treated with CFA or PBS (Fig 3A–3C). As expected, CFA treatment decreased the fungal load compared with PBS, whereas rPbHsp60 + CFA duplicated the fungal load the examined organs, indicating that infection dissemination was lower in animals treated with CFA alone and maximum in mice injected with rPbHsp60 + CFA. Consistently, histopathological analysis showed that rPbHsp60 + CFA-injected mice had tissue injury more pronounced than CFA- or PBS-treated mice, an observation that was certified by the morphometric analysis of granulomatous lesions in the lung, liver, and spleen sections of the infected animals: the lesions occupied areas at least 50% more

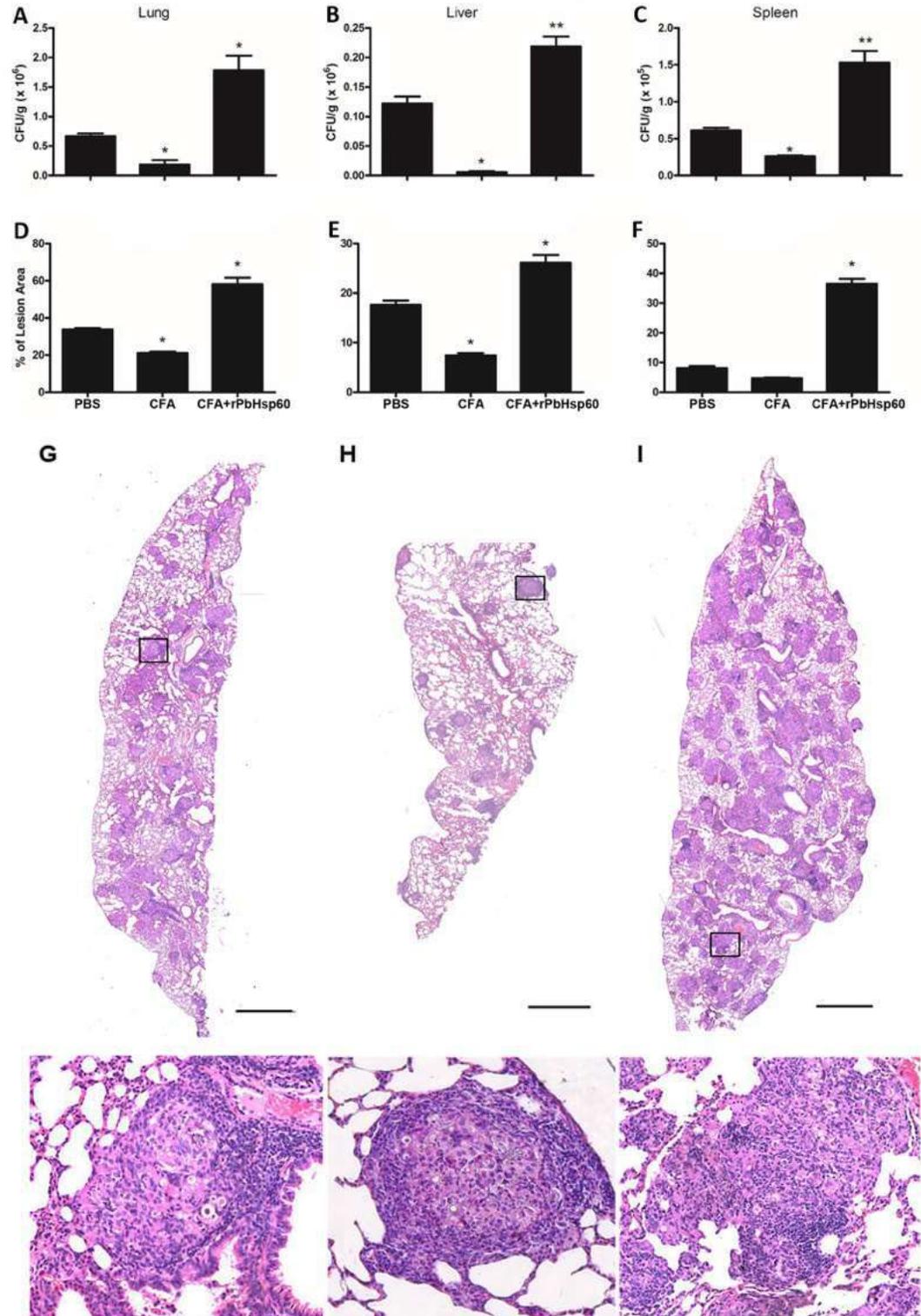


Fig 3. Recombinant PbHsp60 disrupts the beneficial effect of CFA on experimental PCM. Mice inoculated with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated, on day 21 postinfection, with PBS, CFA, or CFA emulsified rPbHsp60 (rPbHsp60 + CFA; 50 μ g). Thirty days after the treatment animals were sacrificed and lung (A), liver (B), and spleen (C) homogenates were analyzed for the CFU of *P. brasiliensis* yeast cells. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of five mice per group obtained from three independent experiments. Sections (5- μ m) of

these organs were stained with H&E and microscopically analyzed for the extension of granulomatous lesions using Image J software (panels D-F). Bars represent the mean \pm standard deviation of percentage lesion areas; * $P < 0.05$ compared with the other groups. Panels G to I show representative images captured from the pulmonary tissue of mice of each experimental group: PBS-treated (G), CFA (H) and rPbHsp60 + CFA (I). Scale bars of the lung sections indicate 1 mm. Images in the bottom panel correspond to black squares indicated on the upper panels.

doi:10.1371/journal.pone.0162486.g003

extended of the organs from rPbHsp60 + CFA-treated mice (Fig 3D–3F). Details of the pulmonary histology of the three groups of infected mice can be seen in Fig 3, Panels G–I. The comparative analysis of these panels shows that treatment with rPbHsp60 + CFA resulted in the formation of numerous loose granulomas with inflammation foci and dissemination of yeast cells in the lungs, whereas the CFA-treated mice displayed the most compact and well-structured granulomas (Fig 3H).

rPbHsp60 Administration Increases the Production of Cytokines in the Lungs of *P. brasiliensis* Infected Mice

We next investigated whether increased fungal load and pulmonary lesions in rPbHsp60 alone or rPbHsp60 + CFA-treated mice were associated with an unfavorable pattern of cytokine production in the lungs. Compared with CFA- or PBS-treated mice, the lungs of rPbHsp60 alone or rPbHsp60 + CFA-injected mice showed higher concentrations of different cytokines, including those of inflammatory (IL-17 and TNF- α), Th1 (IL-12 and IFN- γ), Th2 (IL-4), and regulatory (IL-10 and TGF- β) profiles (Fig 4). Notably, the most remarkable increase concerned the concentrations of proinflammatory cytokines IL-17, TNF- α , and IFN- γ , a condition that was consistent with severe inflammation and high fungal load observed in the lungs of rPbHsp60-treated mice (Fig 4).

Discussion

To find components of *P. brasiliensis* yeasts that might affect the outcome of PCM, we isolated an enriched fraction of PbHsp60, which had detrimental effects when administrated to *P. brasiliensis*-infected mice. The recombinant counterpart of PbHsp60 was prepared and administered to infected mice and reproduced the detrimental effects of the native preparation. In both cases, the treatment resulted in increased fungal load and disseminated disease, as well as in severe pulmonary inflammatory lesions. Furthermore, nPbHsp60 and rPbHsp60 antagonized the beneficial effects of CFA, a known inducer of Th1 immunity that confers protection against PCM [23]. Detection of high pulmonary concentrations of several cytokines, particularly inflammatory cytokines, suggested that aggravation of PCM resulted from a dysregulated immune response induced by rPbHsp60 administration.

Hsps are evolutionarily well-conserved proteins that function as molecular chaperones. Hsps play key roles in cellular homeostasis; participate in protein folding, unfolding, and assembly; and prevent protein aggregation and denaturation [26]. Although existing in basal conditions with their housekeeping functions in the cells, Hsps have their expression upregulated and are also fundamental to cell survival under stress, such as high temperatures, toxins, and oxidative conditions [27]. In dimorphic fungi, including *P. brasiliensis*, Hsps expression is increased during the conidia to yeast transition [28, 29], an event that may be important in the fungal pathogenesis when conidia reach the lungs of hosts [30]. In the characterization studies of Hsp60 from *P. brasiliensis*, the authors showed that this protein was overexpressed during morphological transition [31] and was recognized by sera from humans with PCM [31, 32]. Besides heat shock, host systems exert additional stress by inducing immune response to prevent fungal colonization and tissue invasion, suggesting that Hsps are required for promoting

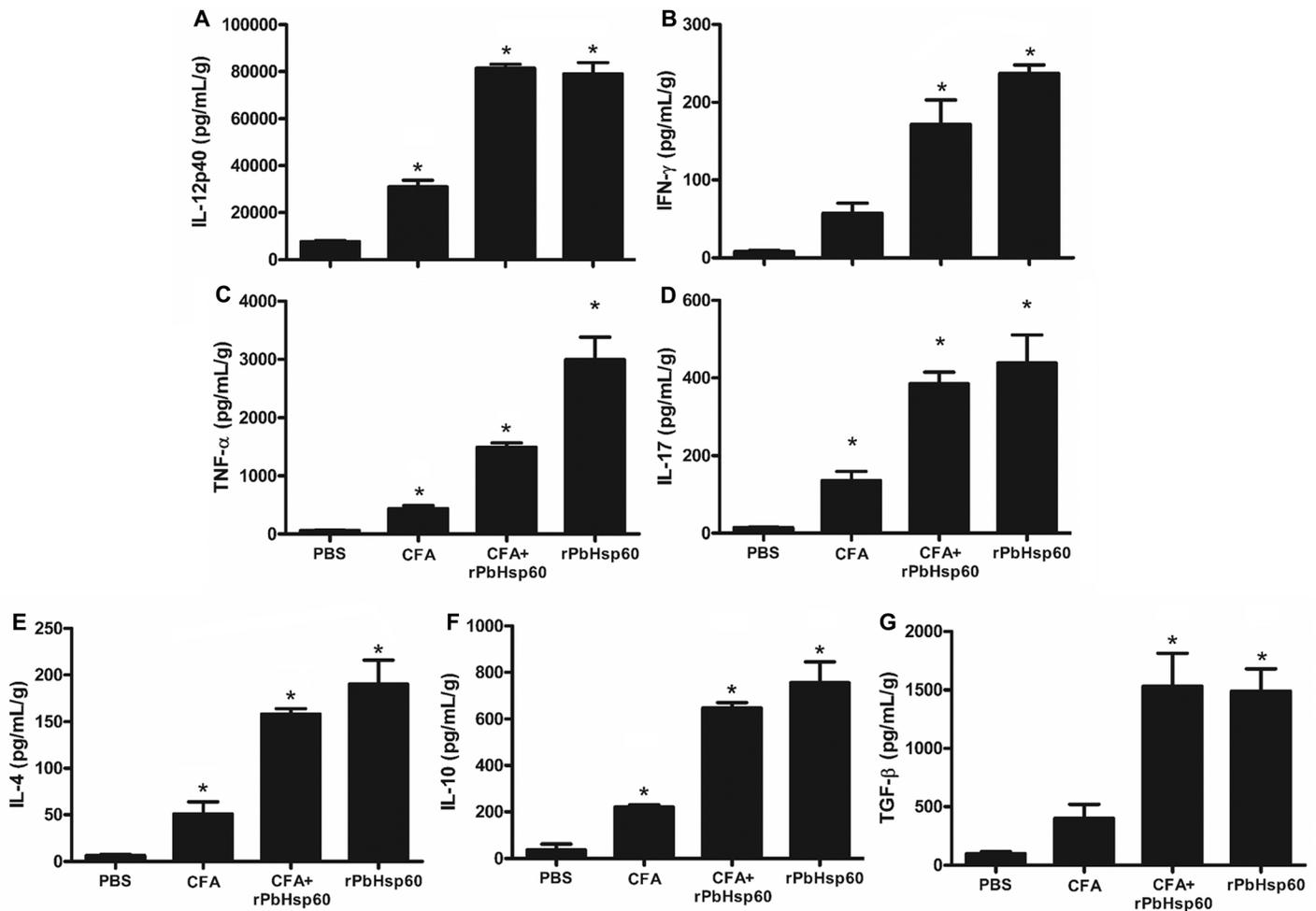


Fig 4. Treatment of *P. brasiliensis*-infected mice with rPbHsp60 emulsified or not in CFA increases the concentration of all the tested cytokines. Mice injected with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated with PBS, CFA, rPbHsp60 alone (rPbHsp60) or emulsified in CFA (PbHsp60 + CFA) on day 21 postinfection. Lung homogenates obtained from these mice on day 30 after the treatment were analyzed for the concentrations of (A) IL-12, (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-17, (E) IL-4, (F) IL-10, and (G) TGF- β . Data are expressed as the mean \pm standard deviation of five mice per group obtained from three independent experiments; * $P < 0.05$ compared with the other groups.

doi:10.1371/journal.pone.0162486.g004

fungal survival within hosts. This also suggests that Hsps are one of the main targets of immune response [33].

Because fungal Hsp60s are immunodominant antigens that trigger strong cellular and humoral immune responses [27, 34, 35], they are interesting therapeutic and vaccinal targets [36]. Soares et al. [37] reported that rPbHsp60 may serve as an efficient vaccine component for treating experimental PCM. The differences between our results and those of Soares et al. [37] may be due to the different infection routes and protocols for the administration of recombinant PbHsp60. While Soares et al. [37] used intranasal infection, we performed intravenous infection, which mimics a disseminated form of the disease and advantageously constitutes a model for preclinical therapeutic trials [38]. Furthermore, we administrated rPbHsp60 in a therapy regimen, whereas Soares et al. [37] adopted a prophylactic regimen. The protocol used in the present study was designed on the basis of a previous study where treatment of *P. brasiliensis*-infected mice with CFA decreased fungal load in up to 2-log and substantially increased

the concentrations of protective cytokines [23]. In the present study, treatment of *P. brasiliensis*-infected mice with rPbHsp60 + CFA increased fungal load, number of diffuse granulomas with inflammation foci, and levels of all cytokines in lungs compared with that in *P. brasiliensis*-infected mice treated with CFA alone. Increased concentrations of proinflammatory cytokines (IL-17, TNF- α and IFN- γ) after rPbHsp60 treatment of *P. brasiliensis*-infected mice aggravated PCM, leading to severe inflammation, host tissue damage, impaired granuloma formation, and *P. brasiliensis* dissemination. Although anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β prevent inflammatory damage [39], lack of equilibrium in cytokine concentrations may favor tissue destruction. The risks of dysregulated cytokine production are clearly noted in other diseases, as septic shock syndrome [40, 41], which has a high mortality rate in humans [42]. Though anti-inflammatory cytokines are produced to compensate the high levels inflammatory response in patients with septic shock syndrome, they may be harmful, leading to cutaneous anergy, reduction of lymphocytes, decreased of monocytes response to cytokine stimulation, as well as decrease of human leukocyte antigens on monocytes [43]. Like in sepsis, an excessive cytokine production was harmful in *P. brasiliensis*-infected mice treated with PbHsp60, since that dysregulation may have been responsible, at the same time, for increased inflammation and tissue damage and decreased protective immune response against to *P. brasiliensis*, increasing the number of yeast in the tissue. Indeed, a fine-tuning between resistance and tolerance may explain the aspects of fungal infection, such as immunopathology and persistence [44].

Our study provides evidences that administered rPbHsp60 accounts for severe lesions in PCM and allows us to propose that PbHsp60 contributes to the fungal pathogenesis. Moreover, results of this study provide a perspective for controlling exacerbated immune responses and for designing new treatment approaches to induce appropriate immune response against deep mycosis.

Supporting Information

S1 Fig. MS/MS Mascot search data of the 60-kDa protein from *P. brasiliensis*. The 60-kDa band from *P. brasiliensis* was excised from the electrophoresis gel and digested *in situ* with trypsin. Peptides were extracted from gel and dried, resuspended in 50 μ l 1% formic acid, centrifuged and transferred to HPLC vial. Spectrometry analyses were performed on an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer equipped with an Agilent 1200 series liquid chromatograph and an Agilent Chip Cube LC-MS interface (1D nLC-MS-MS). Mascot (version 2.3; Matrix, United Kingdom) analysis was performed to identify peptides and to search for proteins in the NCBI nonredundant (nr) database.

(TIF)

S1 Table. List of all proteins matched with at least one peptide with a significant score.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Denise B. Ferraz, Patrícia E. Vendruscolo, Ana Flávia Gembre, and Vani Maria Alves for providing excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FFF LLO APC.

Performed the experiments: FFF LLO TNL GP MVC.

Analyzed the data: FFF LLO MCRB APC.

Contributed reagents/materials/analysis tools: AAMCC VLDB MCRB APC.

Wrote the paper: FFF AAMCC VLDB MCRB APC.

References

1. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaioordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(3):390–394. PMID: [10497977](#)
2. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(1): 65–73. PMID: [16151188](#)
3. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2):273–283. doi: [10.1016/j.ympev.2009.04.005](#) PMID: [19376249](#)
4. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peracoli MT. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998; 40(3): 125–135. PMID: [9830725](#)
5. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CF. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1979; 67(2): 115–118. PMID: [481558](#)
6. Bethlem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med.* 1999; 5(5): 319–325. PMID: [10461538](#)
7. Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57 Suppl 19:11–20. doi: [10.1590/S0036-46652015000700004](#) PMID: [26465364](#)
8. de Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994; 36(2): 185–192. PMID: [7997797](#)
9. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* 1977; 62(2): 77–86. PMID: [340954](#)
10. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). *Cad Saude Publica.* 2002; 18(5): 1441–1454. PMID: [12244377](#)
11. Robledo MA, Graybill JR, Ahrens J, Restrepo A, Drutz DJ, Robledo M. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 125(5): 563–567. PMID: [7081817](#)
12. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol.* 2005; 125(1): 1–8. PMID: [15982296](#)
13. Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009; 47(7): 722–733. doi: [10.3109/13693780802641425](#) PMID: [19888805](#)
14. Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesi JL, de-Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27(9): 2309–2313. PMID: [7787814](#)
15. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62(4): 1465–1469. PMID: [8132354](#)
16. Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, Souza AC, Faccioli LH, Coelho-Castelo AA, et al. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine.* 2010; 28(6): 1528–1534. doi: [10.1016/j.vaccine.2009.11.062](#) PMID: [20045500](#)
17. Rittner GM, Munoz JE, Marques AF, Nosanchuk JD, Tabora CP, Travassos LR. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2): e1519. doi: [10.1371/journal.pntd.0001519](#) PMID: [22389734](#)
18. Reis BS, Fernandes VC, Martins EM, Serakides R, Goes AM. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* 2008; 26(43): 5461–5469. doi: [10.1016/j.vaccine.2008.07.097](#) PMID: [18722494](#)
19. Fernandes VC, Martins EM, Boeloni JN, Coitinho JB, Serakides R, Goes AM. Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS One.* 2011; 6(3): e17885. doi: [10.1371/journal.pone.0017885](#) PMID: [21423771](#)
20. Fernandes VC, Martins EM, Boeloni JN, Coitinho JB, Serakides R, Goes AM. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in

- experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2011; 13(12–13): 1062–1072. doi: [10.1016/j.micinf.2011.06.004](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.004) PMID: [21726659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21726659/)
21. Alegre-Maller AC, Mendonca FC, da Silva TA, Oliveira AF, Freitas MS, Hanna ES, et al. Therapeutic administration of recombinant Paracoccin confers protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection: involvement of TLRs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(12): e3317. doi: [10.1371/journal.pntd.0003317](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003317) PMID: [25474158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25474158/)
 22. Calich VL, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia.* 1979; 66(3): 175–177. PMID: [375098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/375098/)
 23. de Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CR, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(3): e183. doi: [10.1371/journal.pntd.0000183](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000183) PMID: [18335066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18335066/)
 24. Alekseeva MG, Mavletova DA, Kolchina NV, Nezametdinova VZ, Danilenko VN. Isolation and purification of recombinant serine/threonine protein kinases of the strain *Bifidobacterium longum* B379M and investigation of their activity. *Biochemistry (Mosc).* 2015; 80(10): 1303–1311.
 25. Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003; 5(5): 413–418. PMID: [12737997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12737997/)
 26. Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(12): a004390. doi: [10.1101/cshperspect.a004390](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004390) PMID: [21123396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21123396/)
 27. Falkowska-Podstawka M, Wernicki A. Heat shock proteins in health and disease. *Pol J Vet Sci.* 2003; 6(1): 61–70. PMID: [12675471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12675471/)
 28. Hernandez O, Garcia AM, Almeida AJ, Tamayo D, Gonzalez A, Restrepo A, et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast.* 2011; 28(11): 771–781. doi: [10.1002/yea.1902](https://doi.org/10.1002/yea.1902) PMID: [21960298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21960298/)
 29. Nicola AM, Andrade RV, Dantas AS, Andrade PA, Arraes FB, Fernandes L, et al. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 158. doi: [10.1186/1471-2180-8-158](https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-158) PMID: [18808717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18808717/)
 30. Restrepo A, Cano LE, Gonzalez A. The power of the small: the example of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57 Suppl 19: 5–10. doi: [10.1590/S0036-46652015000700003](https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700003) PMID: [26465363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26465363/)
 31. Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2001; 39(5): 445–455. PMID: [12054056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12054056/)
 32. Cunha DA, Zancoppe-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS Jr., et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(2): 374–377. PMID: [11874881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11874881/)
 33. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.* 1990; 11(4): 129–136. PMID: [2187470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2187470/)
 34. Moingeon P, Almond J, de Wilde M. Therapeutic vaccines against infectious diseases. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6(5): 462–471. PMID: [14572538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14572538/)
 35. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 19–39. PMID: [9880473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9880473/)
 36. Bolhassani A, Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2008; 7(8): 1185–1199. doi: [10.1586/14760584.7.8.1185](https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1185) PMID: [18844593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18844593/)
 37. Soares RBA, Gomez FJ, de Almeida Soares CM, Deepe GS Jr., Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infect Immun.* 2008; 76(9): 4214–4221. doi: [10.1128/IAI.00753-07](https://doi.org/10.1128/IAI.00753-07) PMID: [18625731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18625731/)
 38. Ueda AK, Franco M, Fabio SA, Prestes FR. Ketoconazole in the treatment of experimental murine paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1987; 98(1): 27–34. PMID: [3587333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3587333/)
 39. Kurokawa CS, Araujo JP Jr., Soares AM, Sugizaki MF, Peracoli MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(4): 421–428. PMID: [17446681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17446681/)
 40. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002; 420(6917): 885–891. PMID: [12490963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490963/)
 41. Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Coimbra R. Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. *J Trauma.* 1996; 40(5): 702–709. PMID: [8614067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8614067/)

42. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007; 35(5): 1244–1250. PMID: [17414736](#)
43. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med*. 2008; 29(4): 617–625, viii.
44. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(4): 275–288. doi: [10.1038/nri2939](#) PMID: [21394104](#)



Brief Report

Therapeutic effect of monophosphoryl lipid A administration on *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice

Taise Natali Landgraf¹, Fabrício Freitas Fernandes², Gabriela Peron³ and Ademilson Panunto-Castelo^{4,*}

¹Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, ²Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, ³Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, SP and ⁴Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Ademilson Panunto-Castelo, Departamento de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900. 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55-16-3315-0454; E-mail: apcastelo@usp.br

Received 31 March 2016; Revised 25 July 2016; Accepted 28 July 2016

Abstract

The lack of antifungals with low toxicity and short-term therapy for patients with paracoccidioidomycosis (PCM) led us to evaluate adjuvants in immunotherapeutic intervention. We have previously shown complete Freund's adjuvant (CFA) to be therapeutic on experimental PCM. Owing to CFA toxicity, here we tested adjuvants approved for clinical use or in preclinical phase in experimental mouse PCM. Of all, only monophosphoryl lipid A (MPLA) demonstrates a beneficial effect, by reducing the fungal burden and increasing the concentrations of IFN- γ and TNF- α , which are immunoprotective in PCM. These results suggest that MPLA might improve intervention in PCM.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, monophosphoryl lipid A, immunotherapy, adjuvants.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic granulomatous mycosis caused by thermally dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*.¹ PCM is the most important systemic mycosis in Latin America. In Brazil, PCM is the eighth most important cause of mortality among chronic infectious diseases.²

Regarding to immunological response, type 1 helper T cells (Th1) are immunoprotective in PCM. These cells initially secrete high levels of TNF- α and IFN- γ , followed by

continuous production of interleukin (IL)-2 and IFN- γ . On the other hand, susceptibility was linked to depressed cellular immunity, characterized by Th2 immune response with secretion of IL-4, IL-5, IL-10, and TGF- β .^{3,4}

Currently, conventional treatments include sulfone and azole derivatives. In severe and disseminated forms of PCM, amphotericin B has been used.² Frequently, treatment with these agents is protracted and the main concerns are non-compliance, side effects such as toxicity, and drug resistance



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Therapeutic effect of DNA vaccine encoding the 60-kDa-heat shock protein from *Paracoccidioides brasiliensis* on experimental paracoccidioidomycosis in mice

Igor Emiliano L. Souza^a, Fabrício F. Fernandes^b, Maria Cristina L. Schiavoni^a, Célio L. Silva^a, Ademilson Panunto-Castelo^{c,*}

^aRibeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^bPaulista University, 14024-270 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^cDepartment of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences, and Letters at Ribeirão Preto – University of São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2019

Received in revised form 20 July 2019

Accepted 26 July 2019

Available online 6 August 2019

Keywords:

Paracoccidioides

DNA vaccine

Heat-shock protein

Paracoccidioidomycosis

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis autochthonous to Latin America and endemic to Brazil, which has the majority of the PCM cases. PCM is acquired through the inhalation of propagules of fungi from genus *Paracoccidioides* spp. and mainly affects the lungs. We have previously shown that *P. brasiliensis*-infected mice treated with single-dose of recombinant 60-kDa-heat shock protein from *P. brasiliensis* (rPbHsp60) had a worsening infection in comparison to animals only infected. In this study, we investigate whether the treatment of infected mice with *PB_HSP60* gene cloned into a plasmid (pVAX1-*PB_HSP60*) would result in efficient immune response and better control of the disease. The harmful impact of single-dose therapy with protein was not seen with plasmid preparations. Most importantly, three doses of pVAX1-*PB_HSP60* and protein induced a beneficial effect in experimental PCM with a reduction in fungal load and lung injury when compared with infected mice treated with pVAX1 or PBS. The increase of the cytokines IFN- γ , TNF, and IL-17 and the decrease of IL-10 observed after treatment with three doses of pVAX1-*PB_HSP60* appears to be responsible for the control of infection. These results open perspectives of the therapeutic use of Hsp60 in PCM.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic infection caused by thermodynamically fungi of the genus *Paracoccidioides*. The infection begins when the host inhales airborne fungal propagules, such as conidia or mycelial fragments, from the environment. In the lung, the fungus modifies its hyphae form to yeast one in response to the body temperature of the host [1,2], and triggers a chronic granulomatous inflammatory reaction in the host [3].

Although PCM is endemic in Latin America, from southern Mexico to northern Argentina, its distribution in these areas is not uniform [4]. In Brazil, which has the most of the cases, PCM is the eighth most common cause of death among chronic and recurrent infectious diseases, has a mortality rate higher than leishmaniasis,

besides to be considered the systemic mycosis with the highest mortality rate [5].

Besides to require a long-lasting therapy, the treatment for PCM has the potential to trigger undesirable side effects. Therefore, some patients abandon the treatment, making decreases the chances for the successful outcome [6]. Hence, several groups have been trying to find immunotherapy strategies for experimental PCM [7–9], such as the studies with a peptide of 15 amino acids derived from gp43, the most studied antigen of *P. brasiliensis*, called peptide P10, which presented as a good candidate in the therapy [10] even when was used the therapy strategy with dendritic cells primed with p10 [11]. Promising results also were obtained when recombinant Pb27 and Pb40 from *P. brasiliensis* were used for the treatment of experimental PCM in mice [12].

Our group has also been seeking in latest years to research the use of antigen- and adjuvant-based therapies in PCM [7]. Among the evaluated molecules, 60-kDa-heat shock protein from *P. brasiliensis* (PbHsp60) in either the native or recombinant form (rPbHsp60) induced a detrimental effect on PCM when a single-dose of them was administered therapeutically in infected mice.

* Corresponding author at: Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: apcastelo@usp.br (A. Panunto-Castelo).



Original Article

Biochemical characterization and analysis of gene expression of an α -mannosidase secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*

Priscila C. Corrêa¹, Fabrício F. Fernandes², Marcelo V. Costa³, Taise N. Landgraf⁴ and Ademilson Panunto-Castelo ^{3,*}

¹Graduate Program in Basic and Applied Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil, ²Paulista University, 14024-270, Ribeirão Preto, SP, Brazil, ³Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil and ⁴Anhanguera Educational, Leme, 13614-370, SP, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Ademilson Panunto Castelo, PhD, Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900. ZIP Code 14040-901. Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55-16-3315-0454; E-mail: apcastelo@usp.br

Received 12 August 2021; Revised 14 December 2021; Editorial Decision 31 December 2021

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the *Paracoccidioides* genus, being endemic in Latin America and with the highest number of cases in Brazil. *Paracoccidioides* spp. release a wide range of molecules, such as enzymes, which may be important for PCM establishment. Here, we identified the 85- and 90-kDa proteins from the supernatants of *P. brasiliensis* cultures as being an α -mannosidase. Because the expected mass of this α -mannosidase is 124.2-kDa, we suggest that the proteins were cleavage products. Indeed, we found an α -mannosidase activity in the culture supernatants among the excreted/secreted antigens (ESAg). Moreover, we determined that the enzyme activity was optimal in buffer at pH 5.6, at the temperature of 45°C, and with a concentration of 3 mM of the substrate p-NP- α -D-Man. Remarkably, we showed that the gene expression of this α -mannosidase was higher in yeasts than hyphae in three *P. brasiliensis* isolates with different virulence degrees that were grown in Ham's F12 synthetic medium for 15 days. But in complex media YPD and Fava Netto, the significantly higher gene expression in yeasts than in hyphae was seen only for the virulent isolate Pb18, but not for intermediate virulence Pb339 and low virulence Pb265 isolates. These results about the high expression of the α -mannosidase gene in the pathogenic yeast form of *P. brasiliensis* open perspectives for studying this α -mannosidase concerning the virulence of *P. brasiliensis* isolates.

Lay summary

Paracoccidioides brasiliensis causes deep mycosis, paracoccidioidomycosis. We determined for the first time the biochemical properties of an α -mannosidase released by this fungus. We suggest that the enzyme gene expression in the fungus is associated with fungal morphology, stress, and virulence.

Key words: *Paracoccidioides*. Extracellular antigens. Glycosyl hydrolase. α -Mannosidase, Fungal infection.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis, *P. lutzii*, *P. americana*, *P. restripiensis*, and *P. venezuelensis* are currently recognized as the etiological agents of paracoccidioidomycosis (PCM).¹ PCM is endemic

in Latin America, Brazil being the country with the highest number of patients, i.e., about 85% of all registered cases.^{2–5} In humans, *Paracoccidioides* spp. can cause infections that range from asymptomatic or subclinical infection to disseminated disease,⁵